

Thesis, FRANZEN Rachelle

Auteur : Van Hoyer, Odile

Promoteur(s) : DERoyer, Céline

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2025-2026

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/25971>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Implication de CEMIP (KIAA1199) dans les processus de fibrose, d'inflammation et de vasculopathie associés à la sclérodermie systémique

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master
en Sciences Biomédicales*

Année académique 2025 - 2026



Odile Van Hoya

Promoteur : Dr. Céline Deroyer

Superviseur : Pauline Salpetier

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier ma promotrice de mémoire, Céline Deroyer, de m'avoir permis d'intégrer le Laboratoire de Rhumatologie au sein du GIGA de l'Université de Liège. Je lui suis sincèrement reconnaissante pour sa bienveillance, sa disponibilité et la qualité de son encadrement tout au long de ce projet. Ses conseils et sa confiance ont grandement contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je souhaite également remercier Pauline Salpetier, doctorante au sein du laboratoire, qui a été ma personne de référence durant ces mois de mémoire. Elle m'a permis de m'impliquer dans son projet et a su me guider tout au long de ce travail avec rigueur.

Évidemment, je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe de Rhumatologie, Dominique De Seny, Geneviève Paulissen, Christophe Poulet, Zelda Plener, Sophie Neuville et Gaël Cobraiville, pour leur accueil, leur aide au quotidien et la bonne ambiance sans lesquels ce travail n'aurait pas été le même. Je remercie aussi tous les membres de l'équipe de Gastroentérologie qui ont également contribué à cet accueil et cette convivialité.

Je souhaite aussi remercier mes amies, Ilona Simonts et Charlotte Tonelli, sans qui ces années d'étude n'auraient pas été aussi belles. Merci d'avoir toujours été présentes aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de l'université.

Je n'oublie pas ma famille, en particulier mes parents, qui m'ont constamment accompagnée durant tout mon parcours. Je n'aurais jamais pu y arriver sans leur soutien indéfectible. Merci papa pour ton rôle de "coach" pendant les périodes d'examens et pour tous ces petits mots qui m'ont aidée à garder confiance. Merci maman d'avoir vécu le stress de ce parcours tout autant que moi ! Tu as toujours été là pour m'écouter, me rassurer et croire en moi, même lorsque moi-même je doutais. Je remercie également mon petit copain qui a toujours su me motiver et me pousser vers le haut. Votre présence a été indispensable dans les moments difficiles comme dans les moments de réussite.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Merci à toutes et à tous du fond du cœur.

Odile Van Hoya

RÉSUMÉ

La sclérodermie systémique (SSc) est une maladie auto-immune multisystémique rare caractérisée par une atteinte endothéliale précoce (vasculopathie), une activation immunitaire et un infiltrat inflammatoire conduisant à une fibrose progressive de multiples organes. Elle se manifeste par une fibrose cutanée de sévérité variable ainsi qu'une atteinte de certains organes internes, notamment les poumons, le cœur, les reins et le tractus digestif. Cette grande hétérogénéité rend le diagnostic, le suivi et la prise en charge thérapeutique particulièrement complexes. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif, soulignant la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans ce contexte, CEMIP (Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein également appelée KIAA1199 ou Hybid) apparaît comme une cible intéressante. Des travaux récents, notamment dans l'arthrose, ont mis en évidence ses propriétés pro-inflammatoires et pro-fibrosantes. De plus, des données préliminaires issues du laboratoire de rhumatologie suggèrent son implication dans les mécanismes pathologiques majeurs de la SSc. En effet, une augmentation de son expression a été observée dans des fibroblastes dermiques humains après une stimulation prolongée par le TGF- β , ainsi qu'une surexpression de cette protéine dans la peau de modèles murins de SSc.

L'objectif de ce travail est de mieux caractériser le rôle de CEMIP dans les processus fibrosants associés à la maladie, en particulier dans l'activation des fibroblastes dermiques humains en fibroblastes activés ou myofibroblastes. Pour répondre à cet objectif, des fibroblastes humains dermiques ont été stimulés par du TGF- β ainsi que par du milieu conditionné (MC) provenant de cellules endothéliales humaines activées par du TGF- β et de l'IL-1 β . En parallèle, un modèle murin de SSc induite par l'HOCl a été utilisé dans des souris sauvages (WT) ainsi que des souris knock-out (KO) pour CEMIP afin d'étudier son rôle *in vivo*.

Ce mémoire vise à mieux comprendre l'implication de CEMIP dans la physiopathologie de la SSc à l'aide d'un modèle *in vitro* humain et d'un modèle *in vivo* murin KO pour CEMIP.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a rare multisystem autoimmune disease characterized by early endothelial damage (vasculopathy), immune activation and inflammatory infiltration leading to progressive fibrosis of multiple organs. It manifests as skin fibrosis of variable severity as well as potential involvement of internal organs, notably the lungs, heart, kidneys and gastrointestinal tract. This marked heterogeneity makes diagnosis, monitoring and therapeutic management particularly challenging. Currently, there is no curative treatment, highlighting the need for a better understanding of the underlying pathophysiological mechanisms in order to identify new therapeutic targets.

In this context, CEMIP (Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein, also known as KIAA1199 or Hybid) emerges as a potential biomarker. Recent studies, particularly in osteoarthritis, have demonstrated its pro-inflammatory and pro-fibrotic properties. Moreover, preliminary data from the rheumatology laboratory suggest its involvement in the major pathological mechanisms of SSc. Indeed, an increase in its expression was observed in human dermal fibroblasts after prolonged stimulation with TGF- β , together with elevated protein levels in the skin of a murine model of SSc.

The aim of this work is to better characterize the role of CEMIP in fibrotic processes associated with SSc, in particular, in the differentiation of human dermal fibroblasts into activated fibroblasts or myofibroblasts. To address this objective, human dermal fibroblasts were stimulated with TGF- β , as well as with conditioned medium (MC) derived from human endothelial cells activated with TGF- β and IL-1 β . In parallel, a murine model of HOCl-induced SSc was used in both wild-type (WT) and CEMIP knock-out (KO) mice to investigate its role *in vivo*.

This work aims to investigate the role of CEMIP in the pathophysiology of SSc using both a human *in vitro* model and an *in vivo* murine CEMIP KO model.

ABRÉVIATIONS

ACA	Anticorps anti-centromère
ANOVA	Analyse de la variance
α -SMA	α -smooth muscle actin
ATA	Anticorps anti-topoisomérase I
BLM	Bléomycine
BrdU	5-bromo-2'-désoxyuridine
CEMIP	Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dcSSc	Sclérodémie systémique cutanée diffuse
ECL	Enhanced chemiluminescence
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EndoMT	Transition endothélio-mésenchymateuse
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ET	Endothéline
FBS	Sérum fœtal bovin
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FGFR	Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes
HA	Acide hyaluronique
HDF	Fibroblastes dermiques humains
HE	Hématoxyline éosine
HMW-HA	Acide hyaluronique de haut poids moléculaire
HOCl	Acide hypochloreux
HRP	HorseRadish Peroxydase
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire

HYAL	Hyaluronidase
HYBID	Hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization
IL	Interleukine
IFN	Interféron
KO	Knock-out
lcSSc	Sclérodémie systémique cutanée limitée
LMW-HA	Acide hyaluronique de bas poids moléculaire
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MC	Milieu conditionné
MEC	Matrice extracellulaire
Micro-CT	Microtomographie à rayons X
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MMW-HA	Acide hyaluronique de moyen poids moléculaire
mRSS	Modified Rodnan Skin Thickness Score
MVEC	Microvascular endothelial cells
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
OVN	Overnight
PbH1	Parallel β -helix repeats
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGK	Phosphoglycérate kinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKB (= AKT)	Protéine kinase B
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT-qPCR	PCR quantitative après transcription inverse
siRNA	Small interfering RNA

SSc	Sclérodermie systémique
TGF	Transforming growth factor
Th	Lymphocytes T auxiliaire
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western Blot
WT	Wild-type

TABLE DES MATIÈRES

Introduction.....	- 1 -
1. Sclérodermie systémique.....	- 1 -
1.1. Sclérodermie systémique cutanée limitée	- 2 -
1.2. Sclérodermie systémique cutanée diffuse	- 3 -
1.3. Diagnostic et traitements	- 4 -
1.4. Physiopathologie	- 5 -
• Vasculopathie	- 5 -
• Inflammation et auto-immunité	- 6 -
• Fibrose.....	- 7 -
2. CEMIP.....	- 8 -
2.1. Fonctions de CEMIP	- 10 -
2.2. CEMIP dans les maladies rhumatologiques	- 11 -
• Arthrose	- 11 -
• Polyarthrite rhumatoïde.....	- 12 -
2.3. Pourquoi CEMIP est un bon candidat dans la SSc ?	- 12 -
3. Modèles murins de SSc.....	- 13 -
3.1. Modèle à la bléomycine	- 13 -
3.2. Modèle à l'acide hypochloreux.....	- 14 -
Objectifs et stratégies	- 17 -
Matériel et Méthodes.....	- 18 -
1. Culture cellulaire	- 18 -
1.1. Isolement des fibroblastes.....	- 18 -
1.2. Passage des cellules	- 18 -
1.3. Comptage cellulaire	- 19 -
1.4. Traitement des fibroblastes	- 19 -
• Traitement par du TGF- β	- 19 -
• Traitement par du milieu conditionné de cellules endothéliales activées.....	- 19 -
2. Test de prolifération cellulaire.....	- 20 -
3. Test de viabilité cellulaire.....	- 21 -
4. Western Blot	- 21 -
4.1. Extraction et dosage protéique	- 21 -

4.2.	Migration	- 22 -
4.3.	Transfert	- 22 -
4.4.	Blocage	- 23 -
4.5.	Incubation des anticorps.....	- 23 -
4.6.	Détection et quantification.....	- 24 -
5.	<i>Animaux</i>	- 24 -
6.	<i>Analyses immunohistologiques</i>	- 25 -
7.	<i>Analyses statistiques</i>	- 26 -
Résultats		- 27 -
1.	<i>Effet du TGF-β sur l'expression des marqueurs d'EMT, de fibrose et de CEMIP</i>	- 27 -
1.1.	Lignée de fibroblastes dermiques HDF	- 27 -
1.2.	Fibroblastes dermiques primaires	- 28 -
2.	<i>Impact du milieu conditionné de cellules endothéliales en EndoMT sur les marqueurs d'EMT, de fibrose et CEMIP</i>	- 28 -
2.1.	Effet du milieu conditionné sur la prolifération des fibroblastes.....	- 29 -
2.2.	Effet du milieu conditionné sur la viabilité des fibroblastes	- 30 -
2.3.	Effet du milieu conditionné sur les HDF	- 31 -
2.4.	Effet du milieu conditionné sur les fibroblastes dermiques primaires.....	- 32 -
3.	<i>Rôle de CEMIP dans le développement de la sclérodermie cutanée induite par HOCl</i>	- 33 -
3.1.	Analyse de l'épaisseur dermique	- 33 -
3.2.	Validation au niveau transcriptionnel du modèle murin CEMIP KO	- 35 -
3.3.	Validation au niveau protéique du modèle murin CEMIP KO	- 35 -
Discussion et perspectives		- 37 -
Conclusion		- 42 -
Bibliographie		- 43 -
Annexes		/

INTRODUCTION

1. Sclérodermie systémique

La sclérodermie systémique (SSc) est une maladie auto-immune rare, chronique et multi systémique du tissu conjonctif. Elle se caractérise par une atteinte cutanée et des organes internes (1,2). Cette maladie affecte préférentiellement les femmes et s'accompagne d'une morbidité et mortalité élevée (2,3). La prévalence de cette pathologie oscille entre 5 et 50 cas pour 100 000 personnes (4). Un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux, comme les solvants, la silice et certains médicaments, semble impliqué dans le développement de cette maladie (1). En effet, un des principaux facteurs de risque de la SSc est associé au stress oxydatif.

La SSc est caractérisée par une grande hétérogénéité clinique, tant dans la forme que dans la sévérité des atteintes (2,5). La première manifestation clinique observée dans 90 à 98% des cas est le phénomène de Raynaud, indépendamment de la forme de la maladie (5). Ce phénomène correspond à une altération marquée de la microvascularisation, avec une perte capillaire observée dès le diagnostic. Ceci équivaut donc à une microvascularisation aberrante des doigts qui sont réactifs face au froid et à d'autres stimuli (6,7). Avec l'évolution de la maladie, le phénomène de Raynaud peut s'accompagner de complications ischémiques, telles que des ulcérations digitales et dans les formes sévères, une nécrose digitale (5,6). Il est à noter que le phénomène de Raynaud peut également survenir de manière isolée, en l'absence de SSc.

Les manifestations gastro-intestinales comptent parmi les complications les plus fréquentes et les plus précoces de la SSc. Elles sont rencontrées dans la majeure partie des patients atteints de SSc. Les sujets peuvent être totalement asymptomatiques ou alors subir une malabsorption et malnutrition sévère. L'atteinte œsophagienne est la plus courante. Elle se traduit par des fausses routes, des troubles de la motilité et du reflux (5). Des troubles de l'absorption allant jusqu'à une malnutrition dans les cas extrêmes peuvent également apparaître lorsque l'intestin grêle ou le colon sont touchés. Ces manifestations contribuent à l'altération de la qualité de vie des patients (2,5). L'atteinte cardiaque est un facteur de mauvais pronostic. En effet, 30% de la mortalité des sujets atteints de SSc provient de cette atteinte. Pour ce phénomène clinique aussi, les patients peuvent être asymptomatiques ou présenter des troubles du rythme, une insuffisance cardiaque ou un essoufflement (5,8). La fibrose pulmonaire interstitielle constitue la principale cause de mortalité. Des études estiment qu'environ 50 à 60%

des patients atteints de SSc développeront une atteinte pulmonaire interstitielle au cours de leur maladie (8–10). Cette dernière peut évoluer vers une fibrose pulmonaire progressive, entraînant une dyspnée d'effort et une insuffisance respiratoire (9,10). Une autre complication organique et vasculaire, apparaissant plus tardivement au cours de la maladie et touchant environ 10% des patients, est l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (11). Enfin, des crises rénales sclérodermiques peuvent également apparaître, leur fréquence oscille entre 1 et 14% en fonction des régions du monde. Cette manifestation clinique représente une urgence vitale (12). Ainsi, la diversité et la gravité variable des atteintes cutanées et viscérales entraînent une large hétérogénéité des manifestations clinique. Cela rend la prise en charge nécessairement individualisée (2).

La majorité des patients atteints de SSc présentent des anticorps antinucléaires positifs. Certains auto-anticorps plus spécifiques sont préférentiellement associés à certains phénotypes cliniques, sans toutefois être strictement exclusifs d'un sous-groupe de la maladie (13). D'un point de vue clinique, la SSc est divisée en quatre sous-types. Les deux formes les plus fréquentes sont la SSc cutanée limitée (lcSSc) et la SSc cutanée diffuse (dcSSc) (2,14). Celles-ci sont décrites plus en détails ci-dessous. La troisième forme, dite SSc sine scleroderma, est définie par une atteinte d'organes internes et la présence d'auto-anticorps spécifiques de la SSc (les anticorps anti-topoisomérase I (ATA), les anticorps anti-centromères (ACA) ainsi que les anticorps dirigés contre les ARN polymérases I, II ou III) sans fibrose cutanée visible (15,16). Cette forme correspond à moins de 5% des patients atteints de SSc (17). Enfin, la SSc dite limitée ou précoce (« very early SSc ») est caractérisée par un phénomène de Raynaud, des auto-anticorps spécifiques et/ou des anomalies capillaroscopiques, avant l'apparition de la fibrose cutanée. La SSc demeure une maladie très hétérogène. Cela rend difficile la distinction nette entre les différents sous-types de la maladie (2).

1.1. Sclérodémie systémique cutanée limitée

La lcSSc est la forme la plus fréquente, elle correspond approximativement à 60% des patients atteints de SSc (18). Son épaissement cutané reste localisé au niveau des avant-bras, des jambes et de la tête (*Figure 1*) (2).

D'un point de vue immunologique, la lcSSc est la plupart du temps associée à des anticorps spécifiques du centromère (19). Il semblerait que la présence d'ACA est inversement proportionnelle aux atteintes graves des organes, telles que la crise rénale sclérodermique, l'atteinte myocardique primaire et la fibrose pulmonaire interstitielle. Toutefois, ces auto-anticorps sont corrélés à un risque plus élevé du développement d'HTAP (*Tableau 1*) (20,21). Cette atteinte est donc particulièrement fréquente dans la lcSSc (22).

1.2. Sclérodermie systémique cutanée diffuse

La dcSSc touche environ 35% des patients atteints de SSc (18). Les personnes qui souffrent de dcSSc montrent une atteinte cutanée de tout le corps avec un épaissement rapide et progressif de la peau (*Figure 1*). Cette forme est associée à une évolution plus agressive et à un risque élevé d'implication des organes internes par rapport à la forme limitée, notamment pulmonaires, rénales et cardiaque (2,23). Cela reflète la sévérité de cette forme clinique. Sur le plan fonctionnel, la fibrose cutanée diffuse conduit fréquemment à une diminution progressive de la mobilité et à une perte de la fonction manuelle (2).

Sur le plan immunologique, il a été démontré que la dcSSc est plus fréquemment associée à des ATA ou des anticorps dirigés contre l'ARN polymérase III. Les ATA présentent une forte association au développement d'une maladie pulmonaire interstitielle alors que les anticorps anti-ARN polymérase III sont plutôt assimilés à un risque accru d'une crise rénale sclérodermique (*Tableau 1*) (20,21). L'identification de ces auto-anticorps constitue ainsi un outil pronostique important pour l'évaluation de la sévérité de la maladie (13).

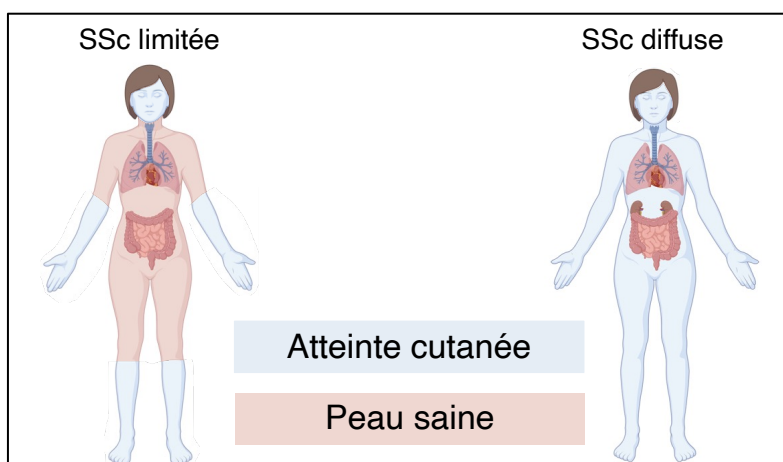


Figure 1 : Représentation de l'atteinte cutanée en fonction de la forme de la maladie. La lcSSc montre une atteinte localisée aux avant-bras, aux jambes sous les genoux et à la tête. Pour la forme diffuse, l'atteinte cutanée touche le tronc et les extrémités proximales également. (*Image réalisée avec BioRender*)

Types d'atteintes	lcSSc	dcSSc
Phénomène de Raynaud	+++	+++
Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)	+++	+
Fibrose pulmonaire interstitielle	Rare	+++
Cardiomyopathie	Rare	+++
Crise rénale sclérodermique	Jamais	+++
Atteinte digestive	+++	+++
Auto-anticorps principaux	Anti-centromère	Anti-topoisomérase

Tableau 1 : Atteintes organiques par rapport au sous-type de la SSc.

1.3. Diagnostic et traitements

Pour déterminer l'avancée de la maladie, les cliniciens utilisent le seul score validé dans cette pathologie : le Modified Rodnan Skin Score (mRSS). C'est une méthode clinique de quantification de l'épaississement de la peau en fonction d'une cotation de 0 (peau normale) à 3 (épaississement sévère) sur 17 sites cutanés (score total de 0 à 51). Bien que le mRSS soit la seule méthode entièrement validée pour l'évaluation clinique de la fibrose cutanée, il présente plusieurs limites importantes, notamment une forte variabilité inter-observateur et une capacité limitée à prédire la sévérité et l'évolution de la maladie (5,24). Ainsi, il existe encore peu de marqueurs fiables permettant d'évaluer l'activité de la maladie et d'en anticiper son évolution (9).

Actuellement, aucun traitement curatif n'est disponible. La prise en charge vise donc à ralentir la progression de la maladie, à prévenir les complications d'organes et à améliorer la qualité de vie des patients. La prise en charge thérapeutique repose sur la combinaison de traitements immunosuppresseurs, antibiotiques et vasculaires adaptés aux différentes atteintes organiques des patients. Le traitement de cette maladie est donc organo-spécifique et adapté à chaque atteinte clinique (25,26).

Cependant, une nouvelle approche thérapeutique innovante de la SSc est en train d'émerger. Cette stratégie repose sur l'utilisation de cellules CAR-T ciblant CD19. Elle vise à éliminer les lymphocytes B, impliqués dans les mécanismes d'auto-immunité et de fibrose associés à la maladie. Cette approche constitue ainsi une perspective thérapeutique prometteuse pour la SSc (27,28).

1.4. Physiopathologie

La physiopathologie de la SSc est caractérisée par trois grands axes : la vasculopathie, l'inflammation et la fibrose. Ces mécanismes interagissent et s'auto-entretiennent, conduisant à la progression de la maladie.

- **Vasculopathie**

Le premier processus correspond à une atteinte vasculaire précoce, due à un dysfonctionnement des cellules endothéliales (7). Cette altération entraîne une perte de l'intégrité vasculaire et une diminution de la microcirculation cutanée (29). Les dysfonctionnements vasculaires observés dans la SSc impliquent une altération globale des mécanismes de prolifération, de différenciation et de perméabilité des cellules endothéliales. Cela résulte d'un déséquilibre de plusieurs voies de signalisation pro- et anti-angiogéniques notamment le VEGF (vascular endothelial growth factor), les angiopoïétines, le PDGF (platelet-derived growth factor), le TGF- β (transforming growth factor β), l'ET-1 (endothéline-1) et divers inhibiteurs de l'angiogenèse (30). Ces facteurs conduisent à une altération de l'angiogenèse et à une dysfonction endothéliale chronique (31).

La transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) apparaît comme un mécanisme clé de la SSc, impliquant une perte du phénotype endothélial et l'acquisition de propriétés mésenchymateuses (3,32). L'EndoMT est induite par plusieurs facteurs impliqués dans la SSc, tels que le TGF- β , l'ET-1, l'IL-1 β (interleukine-1 β) et l'hypoxie (32). Le TGF- β permet la formation de myofibroblastes (33). Ainsi, l'EndoMT constitue une source potentielle de cellules mésenchymateuses contribuant à l'accumulation de myofibroblastes et au développement de la fibrose dans la SSc.

Les cellules endothéliales exercent une activité paracrine sur les fibroblastes (34). Exposées à un stress inflammatoire induit par le TNF- α (tumor necrosis factor- α), l'IFN- γ (interféron- γ), l'IL-1 β ou le TGF- β , elles modifient leur sécrétome et libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que CCL2, IL-6 et IL-8 (29). De plus, les cytokines délivrées par les cellules endothéliales, telles que l'IL-1 β , le bFGF (facteur de croissance des fibroblastes basique), le TGF- β , le PDGF et l'ET-1, modulent les propriétés des fibroblastes en stimulant leur prolifération et leur synthèse de matrice extracellulaire (MEC) (34).

- **Inflammation et auto-immunité**

Le deuxième mécanisme est une inflammation chronique, résultat d'une activation précoce et persistante du système immunitaire, impliquant à la fois l'immunité innée et adaptative (35). Des infiltrats inflammatoires composés notamment de lymphocytes T et B, de macrophages et d'autres cellules immunitaires sont observés dans les tissus atteints (36), où ils participent à la progression de la maladie par la production de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance (37).

Concernant l'immunité adaptative, les lymphocytes T auxiliaires de type 17 (Th17) sont retrouvés en grande quantité dans la SSc. Ils produisent notamment l'interleukine-17A (IL-17A), une cytokine pro-inflammatoire capable de stimuler la prolifération des fibroblastes. Cependant, sa contribution directe à la fibrose reste controversée et semble principalement refléter un état inflammatoire (38). Des facteurs importants dans la SSc sont les cytokines Th2 qui montrent un taux élevé dans les tissus endommagés pendant la maladie. Leur rôle est d'activer la multiplication des fibroblastes ainsi que leur capacité à synthétiser des constituants de la MEC (39). En ce qui concerne les lymphocytes B, ils sont activés de façon anormale. Ils produisent des cytokines, stimulent les fibroblastes et génèrent des auto-anticorps. Ces derniers étant présents chez la majorité des patients atteints de SSc (36).

Un microenvironnement sécrétoire pro-inflammatoire dérivé des cellules endothéliales pourrait promouvoir un phénotype fibroblastique inflammatoire persistant, contribuant à une dégradation excessive de la MEC qui est caractérisée par une surexpression de MMP1 (métalloprotéinase matricielle 1) et une altération du réseau de collagène de type 1 (29). Les MMPs constituent en effet une grande famille d'endopeptidases extracellulaires capables de dégrader sélectivement différents composants de la MEC (40).

Au-delà des métalloprotéinases, d'autres composants de la MEC participent également aux mécanismes inflammatoires et de remodelage tissulaire observés dans la SSc. Parmi ceux-ci, l'acide hyaluronique (HA) occupe une place importante. Le HA est un composant majeur de la MEC. Le HA de haut poids moléculaire (HMW-HA), dont la taille dépasse 1000 kDa est principalement retrouvé dans les tissus sains (41). Il possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrotiques (42). Cela contribue à la stabilité de la matrice et à la protection endothéliale. De plus, HMW-HA est un acteur clé dans la régulation de l'angiogenèse (41). Dans la SSc, le métabolisme du HA est perturbé. En effet, une accumulation tissulaire du HA et une augmentation des fragments circulants contribuent à l'inflammation chronique et au remodelage tissulaire observés dans la maladie (43). Lorsque le HA est dégradé, des fragments de moyen (MMW-HA entre 250 et 1000 kDa) et bas poids moléculaires (LMW-HA en-dessous de 250 kDa) sont générés (44). Les fragments de HA de poids moléculaire intermédiaire participent principalement aux processus de remodelage et de réparation tissulaire tandis que les LMW-HA agissent comme des signaux de danger pro-inflammatoire. Ces fragments, générés par des hyaluronidases, activent les voies pro-inflammatoires via des récepteurs tels que CD44 et TLR4 (toll-like receptor 4) qui stimulent la migration cellulaire et contribuent à l'angiogenèse (45,48). CEMIP (cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein) fait partie de la famille des hyaluronidases. Des travaux suggèrent que l'inhibition de l'activité hyaluronidase de CEMIP entraîne une accumulation de HMW-HA autour des cellules et modifie le comportement des fibroblastes (47).

- **Fibrose**

Le dernier processus est la fibrose qui correspond à un dépôt excessif de tissu conjonctif, caractérisé par un dépôt important de collagène (types I, III et VI), de fibronectine et de protéoglycanes. Celle-ci est causée par les processus de réparation tissulaire en réponse à diverses lésions. En condition normale, lorsque la réparation tissulaire est achevée, les fibroblastes meurent par apoptose. En revanche, si le remodelage tissulaire persiste, cela conduit à une accumulation excessive de MEC (14). La fibrose correspond donc à une cicatrice non résolue caractérisée par une perte de fonction tissulaire (48).

La fibrose résulte de l'accumulation de myofibroblastes, des cellules dotées de propriétés contractiles et d'une forte capacité de synthèse de matrice MEC. Ces cellules proviennent principalement de la différenciation des fibroblastes résidents, mais peuvent également dériver d'autres types cellulaires, notamment des cellules endothéliales via le processus d'EndoMT. Ce phénotype est notamment caractérisé par une augmentation de l'expression de protéines de la MEC, telles que le collagène et la fibronectine, ainsi que l'expression de l' α -SMA (α -smooth muscle actin) qui confère aux myofibroblastes leurs propriétés contractiles (35,49). Le TGF- β est un acteur majeur dans l'initiation et la progression de la fibrose. Il stimule l'expression de gènes qui codent les collagènes et les composants de la MEC. De plus, le TGF- β induit la transdifférenciation de plusieurs types cellulaires en cellules qui produisent du collagène (50). La transmission des signaux pro-fibrotiques de la voie du TGF- β dépend majoritairement de l'action des protéines Smad (51). De plus, le TGF- β agit au sein d'une cascade de cytokines pro-fibrotiques impliquant notamment l'ET-1 et le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF). Ceux-ci amplifient la production de MEC et favorisent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (52).

Des études ont prouvé que les fibroblastes dermiques issus de patients SSc produisent des quantités importantes de MMP-9 lorsqu'ils sont stimulés par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α ou encore le TGF- β . Cette augmentation semble donc découler d'une production accrue par les fibroblastes activés. Cela contribue à la progression de la fibrose. La MMP-9 possède pour substrat principal le collagène de type IV qui est un élément majeur de la membrane basale. Cette dernière est notamment impliquée dans les processus d'invasion cellulaire à travers la membrane basale lors de pathologies (40).

Dans la SSc, l'accumulation persistante de myofibroblastes dans le derme profond est associée à la sévérité de la fibrose cutanée et reflète l'extension systémique de la maladie. Cette fibrose entraîne un épaississement et un durcissement progressif de la peau ainsi qu'une potentielle atteinte fibrotique des organes internes. Cela conduit à l'altération de leur fonction (52).

2. CEMIP

CEMIP (KIAA1199) signifie cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein. C'est une protéine de 153 kDa faisant partie de la famille des hyaluronidases (HYAL) (53). C'est d'ailleurs pour cette raison que CEMIP est également appelé HYBID (hyaluronan-binding protein

involved in hyaluronan depolymerization). Les fonctions de cette protéine ne sont pas encore bien déterminées (45). Elle a d'abord été découverte au niveau de la cochlée où elle est impliquée dans les mécanismes de régulation de la MEC, elle semble également avoir un rôle dans la surdité (54). Ensuite, plusieurs recherches ont démontré l'implication de CEMIP dans différents cancers, notamment en lien avec la progression tumorale et la formation des métastases (55,56). En particulier, CEMIP a été décrit comme un acteur clé dans la migration cellulaire via l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (53,57). Au-delà du cancer, CEMIP est également impliqué dans d'autres pathologies caractérisées par un remodelage anormal de la MEC. Dans l'arthrose, plusieurs travaux ont montré que cette protéine participe activement à la dégradation du HA, ce qui contribue ainsi à l'inflammation articulaire et à la progression de la maladie (35,48,58). De plus, une surexpression de CEMIP a également été observée dans la peau photovieillie. Celle-ci est associée à une altération de l'homéostasie de la MEC, notamment par une fragmentation accrue du HA et du collagène. En effet, la survenue des rides et du relâchement cutané est corrélé à une diminution de la quantité et de la taille du HA dans le derme papillaire provoquée par CEMIP (59).

Sur le plan structurel, CEMIP possède une organisation complexe comprenant un peptide signal d'environ 30 acides aminés en N-terminal, qui dirige la protéine vers la voie de sécrétion. Elle est constituée d'un domaine G8, de deux domaines GG, de quatre domaines PbH1 (parallel β -helix repeats), ainsi que de plusieurs sites de glycosylation N-liés répartis le long de la séquence (*Figure 2*) (60–62). Le domaine G8 est défini par huit résidus de glycine conservés et est présent dans de nombreuses protéines. Il joue un rôle essentiel dans l'activité de CEMIP. Il serait indispensable à la dépolymérisation du HA, notamment grâce à son interaction avec Annexin-1. Cette interaction est nécessaire pour exercer l'activité hyaluronidase de CEMIP. Ce domaine pourrait également influencer la localisation subcellulaire de la protéine, comme suggéré pour d'autres protéines contenant un domaine G8 (60,63). Les études sur la localisation de CEMIP indiquent que c'est une protéine principalement cytoplasmique, associée au réticulum endoplasmique. Elle peut également être sécrétée dans le milieu extracellulaire, suggérant que cette protéine exerce une fonction à l'extérieur de la cellule (64,65). Les domaines GG semblent également impliqués dans la liaison et/ou la dégradation du HA bien que leur fonction précise reste encore mal élucidée. Une seule mutation dans l'un de ces domaines suffit en effet à altérer fortement l'activité de dégradation du HA par CEMIP indiquant leur rôle fonctionnel probable (62).

Enfin, les domaines PbH1 sont retrouvés dans de nombreuses enzymes impliquées dans la dégradation de polysaccharides. Ces domaines suggèrent que ces répétitions en hélice β pourraient contribuer à la capacité de CEMIP à remodeler les composants de la MEC (66,67).

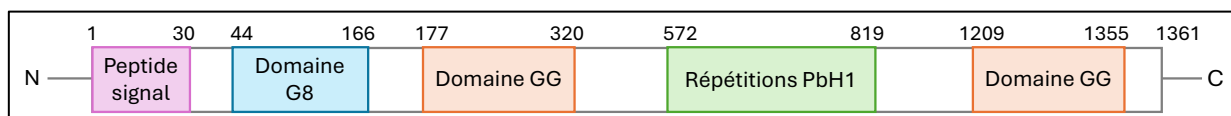


Figure 2 : Structure schématique de CEMIP. (Schéma adapté de Spataro S, et al. 2023) (53)

2.1. Fonctions de CEMIP

CEMIP joue un rôle dans la fibrose et dans l'inflammation. Cette protéine est impliquée dans la dégradation du HA. En effet, deux types de fragments de HA sont issus de cette dégradation ; les MMW-HA et les LMW-HA (68). Les fragments de poids moléculaires intermédiaire résultent de la dégradation partielle du HMW-HA lors du remodelage tissulaire ou de processus inflammatoires. Ils représentent une forme de transition, transportée notamment par le système lymphatique avant d'être d'avantage dégradée. Leur activité biologique est intermédiaire et dépend fortement du contexte tissulaire (69). Il a été démontré que les fragments de HA de bas poids moléculaire créés ont des propriétés pro-inflammatoires (68).

CEMIP active la voie Wnt/ β -caténine ainsi que la voie TGF- β , connues pour jouer un rôle central dans l'activation des fibroblastes et la stimulation de la synthèse des constituants de la MEC (1,48) ; induisant la production de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (1).

De plus, il a été démontré que cette protéine régule les gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (48,53). L'EMT est un processus au cours duquel les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques et obtiennent les propriétés des cellules mésenchymateuses (53). L'activation de l'EMT par CEMIP est médiée par plusieurs cascades intracellulaires incluant les voies PI3K/AKT, MAPK/ERK et Wnt/ β -caténine. Les propriétés mésenchymateuses acquises par ces cellules engendrent des phénomènes d'invasion cellulaire et de remodelage tissulaire. Ces phénomènes sont retrouvés dans les contextes fibrosants et tumoraux (53,70). De plus, l'expression de CEMIP est augmentée dans différents cancers (71). Son rôle pro-tumoral passe à la fois par l'activation de l'EMT et par sa participation à l'angiogenèse, via une dérégulation des marqueurs de l'intégrité vasculaire tels que la VE-cadhérine et VEGFA. Cela favorise la désorganisation du réseau vasculaire et l'apport métabolique aux cellules tumorales (72).

L'ensemble de ces observations positionne CEMIP comme un acteur central du couplage entre inflammation, fibrose, remodelage matriciel et progression tumorale. Il intègre des fonctions qui favorisent la persistance d'un microenvironnement pathologique propice à la progression des maladies chroniques (*Figure 3*) (73).

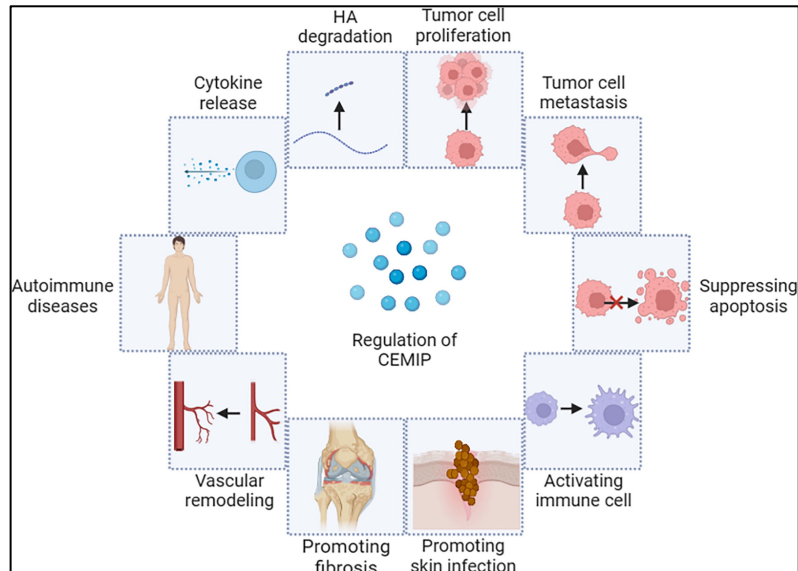


Figure 3 : Résumé des différentes fonctions de CEMIP. (Image issue de Liu Y, et al. 2023) (73)

2.2. CEMIP dans les maladies rhumatologiques

- **Arthrose**

L'arthrose est une maladie articulaire fréquente caractérisée par une atteinte progressive de l'ensemble de l'articulation (74). Cette maladie touche le cartilage et la membrane synoviale, et est associée à une inflammation locale (35,48).

Des études ont montré que l'expression de CEMIP était augmentée dans les fibroblastes et les chondrocytes des patients atteints d'arthrose (48). En effet, les chondrocytes produisent CEMIP sous l'influence de l'interleukine 6 (IL-6). Cela va engendrer une élévation de l'inflammation ostéo-articulaire accompagnée d'une augmentation de la dépolymérisation du HA de haut poids moléculaire (58).

Dans la membrane synoviale arthrosique, l'inhibition de CEMIP entraîne une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, confirmant son rôle régulateur de l'inflammation (35). Par ailleurs, dans les chondrocytes arthrosiques, CEMIP favorise une transdifférenciation vers un phénotype myofibroblastique, caractérisé par l'expression de l' α -SMA et du collagène de type III, deux marqueurs de fibrose (35,48,58).

- **Polyarthrite rhumatoïde**

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une affection inflammatoire chronique des articulations pouvant entraîner des lésions cartilagineuses et osseuses, ainsi qu'une perte de fonction (75). Dans ce contexte, CEMIP est surexprimé dans le tissu synovial et le cartilage, favorisant l'inflammation et la dégradation du HA (53). Bien qu'une augmentation de son expression soit observée, sa fonction dans la PR reste inconnue. De plus, il a été démontré que le niveau d'expression de CEMIP est corrélé avec l'inflammation des tissus synoviaux. En effet, des tissus synoviaux non-enflammés reflètent une expression plus faible de CEMIP comparés aux tissus synoviaux rhumatoïdes. Les patients ayant une PR inactive montrent un taux de CEMIP dans leur sérum, fluide synovial et tissus synoviaux inférieur au taux observé chez les patients avec une PR active. Ces données laissent penser que CEMIP pourrait être utilisé comme biomarqueur de cette pathologie (76).

Dans les synoviocytes de type fibroblastiques issus de patients souffrants de PR, l'IL-6 activerait NF- κ B (nuclear factor- κ B) par l'intermédiaire de la voie de signalisation PI3K/PKB (phosphatidylinositol 3-kinase/protéine kinase B), constituant ainsi le principal mécanisme responsable de l'induction de l'expression de CEMIP (77).

2.3. Pourquoi CEMIP est un bon candidat dans la SSc ?

À ce jour, aucune étude n'a démontré directement l'implication de CEMIP dans la SSc. Néanmoins, la SSc se caractérise par un remodelage de la MEC, incluant une altération du métabolisme du HA (68). Or, CEMIP est une protéine capable de dégrader le HA (69). De plus, plusieurs travaux sur l'arthrose ont mis en évidence un rôle pro-inflammatoire et pro-fibrotique de CEMIP, deux des processus centraux de la physiopathologie de la SSc (1). Il a également été démontré que CEMIP a un rôle pro-inflammatoire et pro-fibrotique dans d'autres maladies comme la maladie de Crohn, la PR et les cancers. Dans la maladie de Crohn, une surexpression

de CEMIP par les fibroblastes intestinaux mène à une dégradation du HA. Cela favorise l'inflammation et la fibrose intestinale (78).

Enfin, CEMIP est impliqué dans les processus de l'EMT, ce qui suggère un rôle dans les mécanismes de plasticité cellulaire (53). Dans ce contexte, il est légitime de s'interroger sur une implication potentielle de CEMIP dans l'EndoMT, un processus reconnu pour contribuer à la fibrose et aux anomalies vasculaires observées dans la SSc (3).

L'implication de cette protéine dans d'autres maladies fibro-inflammatoires soutient le choix d'étudier CEMIP dans la SSc.

3. Modèles murins de SSc

Deux modèles murins sont couramment utilisés pour étudier les atteintes cutanées de la SSc *in vivo* : l'injection sous cutanée de bléomycine (BLM) ou d'acide hypochloreux (HOCl) (*Tableau 2*) (79). Ces deux modèles induisent à la fois un épaissement significatif de la peau et une augmentation des dépôts de collagène dermique ainsi qu'une activation des fibroblastes et une augmentation de la production de cytokines IL-4 et IL-13 par les lymphocytes T (79).

3.1. Modèle à la bléomycine

La BLM est un mélange de glycopeptides (principalement les bléomycines A2 et B2) dérivé de la bactérie *Streptomyces verticillus*. En présence de fer et d'oxygène, elle génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables d'endommager l'ADN en provoquant des cassures simple et double brin (80). Ces dommages cellulaires entraînent une activation des fibroblastes, une infiltration inflammatoire ainsi qu'une augmentation des certaines cytokines comme TGF- β , IL-4 et IL-6 (81).

Grâce à ses propriétés antiprolifératives, la BLM est utilisée comme agent chimiothérapeutique. Cette dernière est inactivée dans l'organisme par la bléomycine hydrolase. Une diminution de l'activité de cette enzyme constitue le fondement des modèles expérimentaux basés sur l'administration de BLM pour induire une fibrose cutanée et pulmonaire (80). En effet, la BLM peut être injectée de façon intradermique ou administrée en intratrachéale (82). Elle est connue pour provoquer une fibrose pulmonaire chez les animaux utilisés dans les modèles expérimentaux seulement lorsqu'elle est donnée en intratrachéale (81). Par contre, les injections

sous-cutanées répétées pendant 4 à 6 semaines vont mener à une inflammation et une fibrose cutanées (83).

Les différentes limites de ce modèle sont que l'administration intratrachéale de BLM induit une mortalité importante et l'atteinte pulmonaire est très hétérogène. En ce qui concerne l'injection intradermique, la BLM provoque une fibrose cutanée locale, avec peu d'atteinte pulmonaire chez la souris (82). De plus, la fibrose observée dans ce modèle est assez limitée au niveau de l'injection, les organes internes ne présentent pas de dommages apparents (80). Il n'a pas été démontré que ce modèle permettait la production d'autoanticorps comme chez l'humain (82). Une dernière limitation est que l'administration répétée de la BLM provoque d'importante fluctuation de sa concentration plasmatique, susceptible d'entraîner une efficacité variable ainsi que des effets indésirables liés aux pics de concentration (83).

3.2. Modèle à l'acide hypochloreux

Les fibroblastes cutanés de patients atteints de SSc produisent spontanément de grandes quantités de ROS. Cela déclenche directement la synthèse de collagène. Les cellules endothéliales génèrent elles aussi des ROS menant à une hyperprolifération des fibroblastes. Des injections de ROS vont donc permettre de reproduire les caractéristiques phénotypiques de la maladie. Un type de ROS fréquemment utilisé est l' HOCl (84).

Le modèle induit par l' HOCl est reconnu comme l'un des plus représentatifs de la SSc. Son développement repose sur la théorie du stress oxydatif, un processus clé de la physiopathologie de la maladie, ce qui en fait un modèle expérimental particulièrement pertinent (82). L' HOCl est une source plus directe de ROS que la BLM (79). Ce modèle est basé sur des injections intradermiques quotidiennes d' HOCl (préparé à partir de NaClO et KH_2PO_4) pendant 6 semaines. Plusieurs ratios de NaClO et KH_2PO_4 ont été testés afin d'optimiser la production d' HOCl . Parmi ces ratios, $\text{HOCl}110$ (1:110) montre une infiltration inflammatoire, suivie d'une fibrose cutanée. En revanche, $\text{HOCl}55$ (1:55) génère des fibroses cutanées et pulmonaires plus marquées. Cependant, les concentrations plus importantes induisent une mortalité beaucoup plus élevée alors que le ratio $\text{HOCl}110$ ne montre aucune mortalité significative. Ce ratio est donc plus sûr pour les expérimentations. Il permet d'évaluer les interactions entre la réponse immunitaire, l'inflammation et la fibrose (82).

Sur la plan histologique, l'épaississement cutané, la compaction des faisceaux de collagène et les liaisons croisées du collagène sont plus marqués que dans le modèle BLM. Les infiltrats immunitaires sont plus variés et généralisés (82). De plus, les traitements par l'HOCl et par la BLM induisent tous deux une augmentation des transcrits de l' α -SMA et du TGF- β , cette régulation étant plus prononcée dans le modèle HOCl. D'un autre côté, une augmentation prononcée des niveaux d'IL-1 β et de MMP-13 est observée chez les souris traitées à la BLM et dans une moindre mesure chez les souris traitées par l'HOCl (79). Le traitement par l'acide hypochloreux induit une forte production de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (82).

Contrairement au modèle BLM, le modèle à l'HOCl permet une production d'autoanticorps, les ATA (82). L'ADN topoisomérase s'avère être un auto-antigène clé dans la dcSSc. Son oxydation contribue d'une part à la réponse auto-immune et d'autre part à l'amplification du stress oxydatif et des lésions tissulaires. Lorsque la topoisomérase 1 est délétée, la prolifération des fibroblastes et la production de ROS reviennent presque à des niveaux basaux. Cela confirme son pouvoir pathogène (84).

Un dernier argument en faveur du modèle HOCl réside dans sa capacité à reproduire l'hyperprolifération spontanée caractéristique des fibroblastes de patients atteints de SSc, contrairement au modèle BLM (84).

Diverses limites sont tout de même rencontrées. Comme mentionné plus haut, la toxicité de ce traitement est dose dépendante. En effet, des doses plus élevées induisent une fibrose plus marquée mais s'accompagnent d'une létalité accrue. De plus, la standardisation du modèle reste encore limitée, ce qui peut affecter la reproductibilité et la comparaison des résultats entre les études (82).

Caractéristiques	Modèle Bléomycine (BLM) en sous-cutané	Modèle Acide Hypochloreux (HOCl)
Mode d'induction	Injections locales répétées de bléomycine (agent chimiothérapeutique) en sous-cutané pendant 4 à 6 semaines	Injections sous-cutanées quotidiennes de HOCl pendant 6 semaines
Mécanisme principal	Toxicité directe de la bléomycine avec génération de ROS et dommages à l'ADN → fibrose locale	Stress oxydatif (central dans la pathogenèse de la SSc) → inflammation, vasculopathie et fibrose systémique
Atteinte cutanée	Fibrose locale au site d'injection, non diffuse	Fibrose diffuse cutanée (peau épaissie, perte du tissu adipeux sous-cutané)
Atteinte pulmonaire	Possible mais hétérogène	Théoriquement présente : fibrose pulmonaire diffuse et infiltration inflammatoire
Autres organes	Généralement peu d'atteinte viscérale	Reins et poumons
Réponse immunitaire	- Infiltration locale de cellules inflammatoires - ↑ TGF-β, IL-4, IL-6	- Infiltrats systémiques - Production médiateurs inflammatoires - Activation voies pro-fibrotiques
Vasculopathie	Modèle essentiellement fibrotique local, sans véritable vasculopathie systémique	Présente → réduction des microvaisseaux, atteinte vasculaire typique de la sclérodermie
Auto-immunité	/	Production ATA → semblable aux patients dcSSc
Avantages	- Simple, reproductible au niveau cutané - Largement utilisé - Idéal pour fibrose cutanée locale	- Modèle plus récent - Modèle plus représentatif de la SSc humaine (triade clinique → fibrose + inflammation + vasculopathie)
Limites	- Lésions limitées au site d'injection - Hétérogénéité des atteintes pulmonaires - Pas de maladie systémique complète - Fluctuation de la concentration plasmatique de BLM	- Toxicité dose-dépendante (HOCl55 plus fibrosant mais plus létal) - Standardisation encore limitée

Tableau 2 : Comparaison des deux modèles utilisés pour induire la SSc. (79–84)

OBJECTIFS ET STRATÉGIES

L'objectif de ce mémoire est d'étudier le rôle potentiel de CEMIP dans la physiopathologie de la SSc, en particulier dans les mécanismes impliqués dans l'activation fibroblastique et le développement de la fibrose cutanée. Plus spécifiquement, ce travail vise à déterminer si : (i) l'expression de CEMIP est modulée dans un contexte pro-fibrotique, (ii) les facteurs sécrétés par des cellules endothéliales engagées dans un processus d'EndoMT induisent un phénotype pro-fibrotique au sein des fibroblastes dermiques et influencent l'expression de CEMIP, (iii) l'absence de CEMIP modifie le développement de la fibrose cutanée rencontrée dans la sclérodermie.

Pour cela, deux approches complémentaires ont été mises en place : un modèle *in vitro* utilisant des fibroblastes dermiques stimulés par du TGF- β et des milieux conditionnés (MC) de cellules endothéliales engagées dans un processus d'EndoMT ; et un modèle *in vivo* de sclérodermie induite par l'HOCl chez des souris sauvages (WT) et des souris knock-out (KO) pour CEMIP.

Ces travaux visent à améliorer la compréhension du rôle potentiel de CEMIP dans la physiopathologie de la SSc et à fournir des éléments permettant d'évaluer son intérêt comme cible thérapeutique potentielle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

1.1. Isolement des fibroblastes

Des biopsies de peau de personnes saines ont été digérées enzymatiquement à l'aide de dispase (*Sigma*, D4693) utilisée à 25 µl/ml pendant une nuit à 4°C ou 90min à 37°C. Une séparation mécanique du derme et de l'épiderme est ensuite réalisée, l'épiderme n'étant pas conservé. Une fois les cellules endothéliales extraites du derme, une digestion avec de la collagénase (*Sigma*, C9891) à 0,5 mg/ml durant une nuit à 37°C est effectuée afin de permettre l'isolement des fibroblastes cutanés. Les biopsies ont été prélevées sur 5 personnes dont 3 femmes (60%) et 2 hommes (40%). L'âge moyen de ces personnes était de 40,6 ans. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du CHU de Liège (2023/252) et par le comité de recherche de la biobanque (BB190058).

En parallèle, une lignée commerciale immortalisée de fibroblastes dermiques humains (HDF) a également été utilisée.

Les fibroblastes dermiques primaires et les HDF ont été maintenus dans un milieu de culture « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) qui contient 4,5 g/l de glucose (*Capricorn Scientific*, DMEM-HPXA). Ce milieu est supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS), 1% de L-glutamine (200 mM, *Lonza*, BE17-605E), 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (*Capricorn Scientific*, PB-B). Les cellules en culture ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

1.2. Passage des cellules

Lorsque les fibroblastes atteignent la confluence, ils sont passés en sous-culture. Les cellules sont rincées avec du PBS 1x (*Capricorn Scientific*, PBS-1A) et de la trypsine 0,25% (*Biowest*, L0931-100) est ajoutée afin de décoller les cellules. La flasque est mise à l'incubateur 2-3 minutes. Le décollement cellulaires est vérifié à l'aide d'un microscope. Les cellules sont récupérées dans un nouveau milieu de culture, puis diluées d'un facteur 2 avant d'êtreensemencées dans une nouvelle flasque. Les cellules ont été utilisées à partir de leur troisième passage afin de s'assurer qu'elles soient pures.

1.3. Comptage cellulaire

Avant chaque expérience, un comptage cellulaire est effectué afin de déterminer la densité cellulaire. La suspension cellulaire (généralement 10 ml) obtenue à la fin du passage / trypsinisation décrite ci-dessus n'est pas directement placée dans une nouvelle flasque. Un mélange contenant un volume égal de suspension cellulaire et de bleu de Trypan est préparé et déposé sur une lame de comptage (lame de Neubauer). Les cellules mortes colorées en bleu sont exclues du comptage, tandis que les cellules non colorées sont comptabilisées comme vivantes (*Figure 4*).

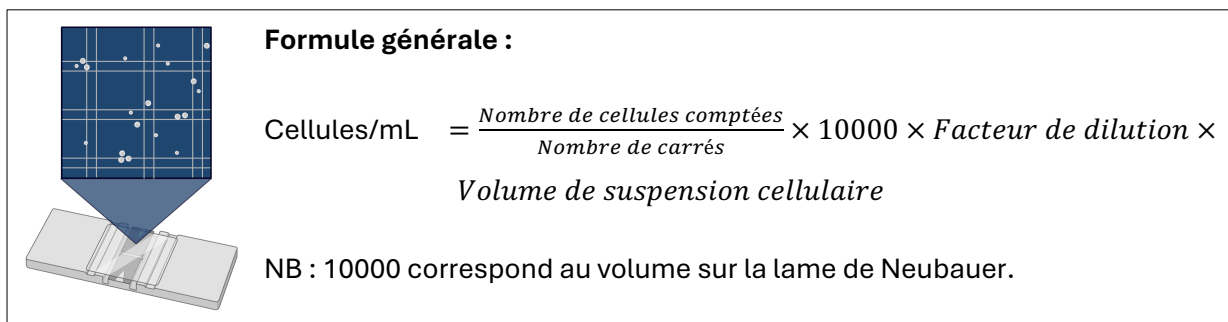


Figure 4 : Formule du comptage cellulaire. (Image réalisée avec BioRender)

1.4. Traitement des fibroblastes

- **Traitement par du TGF- β**

Les fibroblastes dermiques primaires et les HDF ont été stimulés avec TGF- β 1 (10 ng/ml, GIBCO-BRL, PHG9214) pendant 2, 5 ou 7 jours.

- **Traitement par du milieu conditionné de cellules endothéliales activées**

Afin d'étudier l'impact du sécrétome des cellules endothéliales engagées dans un processus d'EndoMT sur les fibroblastes dermiques primaires ainsi que sur les HDF, des cellules endothéliales humaines ont été traitées par un mélange de TGF- β et d'IL-1 β pendant 1, 2 et 3 jours. La validation de l'induction de l'EndoMT sur les cellules endothéliales a été réalisé par l'analyse de l'expression du CD31 et de la fibronectine par Western blot. Ces marqueurs permettent de mettre en évidence une transition phénotypique cellulaire. Plus précisément, l'expression de CD31, marqueur des cellules endothéliales, est diminuée après stimulation par l'IL-1 β et le TGF- β , tandis que la fibronectine, marqueur mésenchymateux absent des cellules endothéliales, est induite suite à cette stimulation.

Les milieux conditionnés (MC) ont été collectés et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation avant mon arrivée au laboratoire. Ces MC ont ensuite été appliqués aux HDF et aux fibroblastes dermiques primaires pendant 2 et 7 jours (*Figure 5*).

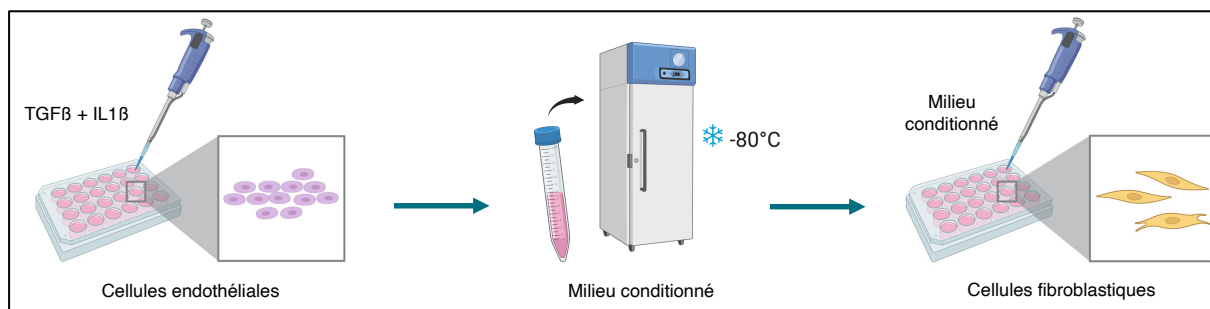


Figure 5 : Étapes d'induction de l'EndoMT sur des cellules endothéliales, collecte du milieu conditionné et traitement des fibroblastes. (Image réalisée avec BioRender)

2. Test de prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est évaluée par incorporation de 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) à l'aide du kit BrdU Cell Proliferation Assay (*Abcam, ab126556*). Les fibroblastes sont ensemencés dans des plaques 96 puits. Le BrdU, un analogue de la thymidine (*Figure 6*), est ensuite ajouté au milieu de culture, puis les cellules sont incubées à 37°C afin de permettre son incorporation dans l'ADN des cellules en phase de synthèse (phase S). À l'issue de l'incubation, le milieu de culture est retiré et les cellules sont fixées à l'aide de la solution de fixation. Après plusieurs lavages, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-BrdU permettant la détection du BrdU incorporé. Un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (HorseRadish Peroxydase - HRP) a ensuite été appliqué. La révélation est réalisée par ajout du substrat chromogène 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), entraînant le développement d'un signal proportionnel au niveau de la prolifération cellulaire. La réaction est arrêtée par addition de la solution stop. L'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur. Plusieurs contrôles ont été inclus, comprenant des puits sans cellules, des cellules non traitées et des cellules incubées sans BrdU.

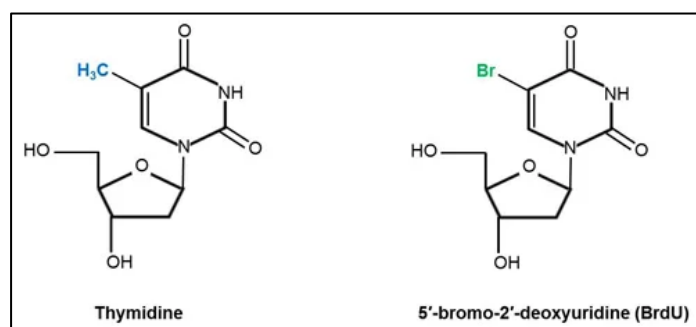


Figure 6 : Structures chimiques des deux analogues.

3. Test de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est caractérisée à l'aide du test MTS. Celui-ci est basé sur la réduction enzymatique du sel tétrazolium MTS (*Promega, G1111*) en un produit formazan soluble par les cellules métaboliquement actives. Les fibroblastes sont cultivés dans des plaques 96 puits. Après traitement, un mélange contenant le réactif MTS et phénazine méthosulfate (PMS) (*Sigma, P9625*) est ajouté à chaque puits. Ensuite, les plaques sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Ce qui permet la conversion du MTS en formazan (*Figure 7*). L'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules viables et elle est mesurée à 450 nm. Des contrôles incluant des puits contenant uniquement le milieu de culture, des cellules non traitées et des cellules traitées par un agent cytotoxique (BAY) ont été utilisés pour valider l'essai.

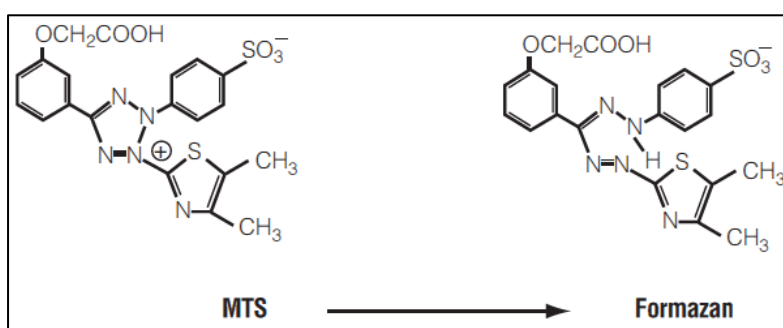


Figure 7 : Réduction du MTS en Formazan.

4. Western Blot

4.1. Extraction et dosage protéique

Les protéines ont été analysées par Western Blot (WB). D'abord, les protéines ont été extraites des cellules cultivées sur les plaques à l'aide d'un tampon de lyse. Celui-ci est composé d'Hepes (20 mM, *Lonza, BE17-737E*), de NaCl (150 mM, *Technical, 27788.297*), de Triton X-100 (0,5%, *Sigma, X100-100ML*), de Glycérol 85% (10%, *Merck, 1.04094.2500*), de DTT (1 mM, *17-1318-02*), d'orthovanadate de sodium (1 mM, *Sigma, S-4136*), de β -glycérophosphate (25 mM, *Sigma, G9422*), de fluorure de sodium (50 mM, *Sigma, S7920-100G*) et d'une pastille d'inhibiteurs de protéases (*Merck, 11697498001*).

Afin d'avoir la même quantité de protéines dans chaque échantillon, un dosage protéique a été réalisé à l'aide d'un kit microBCA (*Thermo scientific, 23235*). Ce kit permet de rapporter les concentrations de nos échantillons par rapport à une courbe étalon. À la suite de ce dosage, les protéines sont diluées dans de l'eau afin de charger une quantité de protéines de 10 μ g.

Les échantillons dilués sont mélangés à du « bleu de Western » qui contient du Tris 1M à pH6,8 (*AnalaR NORMAPUR, 103156X*), du SDS 10% (*Carl Roth, 0183.3*), du glycérol (*Merck, 1.04094.2500*), du bleu de bromophénol (*Plus One, 17-1329-01*) et du β -mercaptoéthanol (*Sigma, M3148-100ML*).

4.2. Migration

Ensuite, les échantillons protéiques sont déposés sur un gel de polyacrylamide. Celui-ci est composé d'un gel de séparation qui varie en fonction de la taille des protéines d'intérêt et un gel de concentration qui reste toujours le même (*Tableau 3*). Ici, nous avons utilisé des gels de séparation de 7% ou 10%.

Puis, la migration des échantillons se déroule par électrophorèse dans une cuve contenant du tampon de migration (TGS : Tris 25 mM, Glycine 192 mM et SDS 0,1%) dilué 10x dans de l'eau déminéralisée. La migration est réalisée à 40 mA jusqu'à ce que le front de migration passe le gel de concentration. Ensuite, l'ampérage est augmenté à 80 mA.

Pour 1 gel	Gel de séparation 7%	Gel de séparation 10%	Gel de concentration	Références
Acrylamide	1,87 ml	2,5 ml	455 μ l	Bio-Rad (1610156)
Eau déminéralisée	2,48 ml	1,85 ml	2,38 ml	/
Glycérol	750 μ l		/	Merck (1.04094.2500)
SDS 5%	300 μ l		140 μ l	Carl Roth (0183.3)
EDTA 0,25M	187 μ l		87,5 μ l	Carl Roth (X986.2)
Tris pH8.8 (1,5M)	1,875 ml		/	AnalaR NORMAPUR (103156X)
Tris pH6.8 (1M)	/		440 μ l	
APS 10%	70 μ l		37 μ l	VWR (0486-25G)
Temed	7,5 μ l		6 μ l	Bio-Rad (161-0800)

Tableau 3 : Composition des gels de WB.

4.3. Transfert

Les protéines sont transférées du gel vers une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) (*Merck, IPVH00010*) à l'aide d'un courant électrique de 40 mA pendant toute une nuit (OVN). La cuve est remplie de tampon de transfert qui est composé de Tris (*AnalaR NORMAPUR*,

103156X), de glycine (*Biotechnology grade*, 0167) et de méthanol (*VWR chemicals*, 20847.360). La membrane est préalablement activée à l'aide de méthanol.

4.4. Blocage

L'étape suivante consiste à bloquer la membrane dans du lait 10% mélangé à du TBS-T [Tris (*AnalaR NORMAPUR*, 103156X), NaCl (*Technical*, 27788.297), Tween 20 (*ACROS organics*, 233360010)] pendant 1h. Cela permet d'empêcher les fixations non spécifiques des anticorps.

4.5. Incubation des anticorps

Les anticorps primaires sont dilués dans un mélange de lait 5% et de TBS-T (*Tableau 4*). L'incubation se réalise pendant 4h à température ambiante. Ensuite, la membrane subit trois lavages avec du TBS-T. Les anticorps secondaires sont sélectionnés par rapport à l'espèce de l'animal utilisée pour l'anticorps primaire (*Tableau 5*). Ces derniers sont incubés pendant 1h à température ambiante. Trois lavages au TBS-T sont également réalisés après l'incubation.

Anticorps primaires	Espèce	Dilution	Concentration finale	Références
Anti- α -SMA	Mouse	1/2000	0,143 $\mu\text{g/ml}$	DAKO mouse (M0851)
Anti-HSP90	Mouse	1/1000	0,2 $\mu\text{g/ml}$	Santa Cruz (Sc-13119)
Anti-CEMIP	Rabbit	1/500	0,4 $\mu\text{g/ml}$	CellSignaling (32041BC)
Anti-Fibronectine	Rabbit	1/1500	0,067 $\mu\text{g/ml}$	CellSignaling (CS26836S)
Anti-Périostine	Rabbit	1/500	2 $\mu\text{g/ml}$	Sigma (SAB4300696)
Anti-Vimentine	Rabbit	1/1500	0,03 $\mu\text{g/ml}$	CellSignaling (5741T)
Anti- β -caténine	Rabbit	1/1000	0,006 $\mu\text{g/ml}$	CellSignaling (8480S)

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés en WB.

Anticorps secondaires	Dilution	Concentration finale	Références
Anti-Rabbit	1/2000	0,039 $\mu\text{g/ml}$	CellSignaling (7074S)
Anti-Mouse	1/2000	0,1135 $\mu\text{g/ml}$	CellSignaling (7076S)

Tableau 5 : Anticorps secondaires utilisés en WB.

4.6. Détection et quantification

La dernière étape du WB est l'étape de détection. Pour ce faire, nous mettons nos membranes en présence d'ECL (Enhanced chemiluminescence) qui utilise le luminol comme substrat (*Thermo scientific, 32106*). En effet, les anticorps secondaires sont couplés à la HRP donc le luminol va réagir avec cette enzyme et cela va produire de la lumière. Cette lumière est capturée sur un film radiographique (*Fujifilm, 47410 19289*).

Les bandes obtenues ont ensuite été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ. Pour chaque échantillon, la densité optique de la protéine d'intérêt a été mesurée puis normalisée par rapport à celle de la HSP90, utilisée comme contrôle de charge.

5. Animaux

Nous avons utilisé des souris femelles C57BL/6 âgées de 6 semaines ($n = 80$). Afin d'étudier le rôle de CEMIP, des souris knock-out (KO) pour ce gène ont été utilisées. Celles-ci proviennent du laboratoire du Pr. Brigitte Malgrange et du Dr. Laurence Delacroix. Ce modèle KO de CEMIP a été généré grâce au système Cre-Lox. Les exons 4 et 5 de ce gène ont été floxés (encadrés par deux sites LoxP). En présence de la recombinaison Cre, ces exons sont excisés. Cela engendre un décalage du cadre de lecture et donc une inactivation du gène (*Figure 8*). Afin d'obtenir une délétion germinale complète, des souris floxées ont été croisées avec des souris qui expriment la recombinaison Cre de façon ubiquitaire à l'aide d'un promoteur PGK (phosphoglycérate kinase). Le fait que ce promoteur soit exprimé ubiquitairement permet une excision totale de ce gène (85).

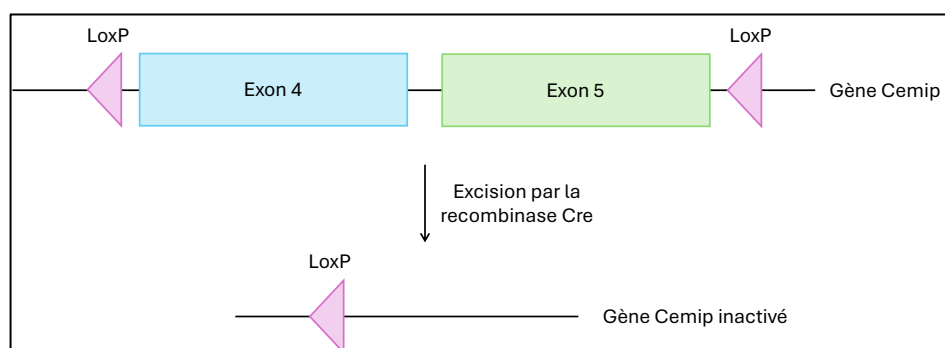


Figure 8 : Représentation du KO pour le gène Cemip. (Schéma adapté de Pressé M. 2023) (85)

L'induction à l'HOCl a été réalisée selon le protocole décrit par Servettaz *et al.* (84). La solution d'HOCl a été préparée quotidiennement avant de réaliser les injections. Celle-ci consiste en un mélange d'une solution de NaClO (2,6% de chlore actif) avec une solution de KH₂PO₄ (100 mM, pH 6,2). L'absorbance de cette solution doit se trouver entre 0,7 et 0,9. Les souris ont reçu deux injections de 100µl d'HOCl par jour en sous-cutanés au niveau du dos préalablement rasé, cinq jours par semaine pendant soit 1 semaine, soit 6 semaines. En effet, le modèle décrit une phase inflammatoire après 1 semaine de traitement et une phase fibrosante après 6 semaines de traitement. Parallèlement, des souris contrôles ont reçu des injections de NaCl. Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'isoflurane avant de les euthanasier par dislocation cervicale. Nous avons collecté la peau du dos pour procéder aux analyses ultérieures. Toutes les expérimentations animales ont été approuvées par le comité d'éthique (20-2550).

	Souris contrôles (NaCl)		Souris sclérodermiques (HOCl)	
	WT	KO	WT	KO
1 semaine de traitement	10	10	10	10
6 semaines de traitement	10	10	10	10

Tableau 6 : Nombre d'animaux utilisés par groupe.

6. Analyses immunohistologiques

Les analyses d'immunohistologie ont été réalisées sur les prélèvements cutanés des souris provenant des différents groupes détaillés juste ci-dessus (*Tableau 6*). Une fixation dans la paraformaldéhyde pendant 1h a été effectuée. Ensuite, les échantillons ont été déshydratés dans l'éthanol 70% avant d'être inclus en paraffine. Des coupes de tissus ont été réalisées et montées sur des lames Superfrost. Une coloration à l'hématoxyline-éosine (HE) a été réalisée par la plateforme d'immunohistologie du GIGA. Les lames ont ensuite été scannées à l'aide du scanner Nanozoomer Digital Pathology 2.0 HT (Hamamatsu photonics, Hamamatsu, Japan). Pour chaque souris, l'épaisseur du derme a été analysée via QuPath à l'aide de 5 mesures prises sur toute la lame et une moyenne a ensuite été réalisée.

7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad PRISM. Tout d'abord les données ont été testées pour leur normalité à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Pour les comparaisons deux à deux du modèle *in vitro*, un t-test apparié a été appliqué lorsque les données suivaient une distribution normale, tandis que le test de Wilcoxon a été utilisé en cas de distribution non normale. Pour les analyses de WB comportant plus de deux comparaisons appariées et présentant une distribution normale, une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un post hoc de Tukey a été réalisée. Lorsque les données ne respectaient pas la normalité, un test non-paramétrique de Friedman suivi d'un post hoc de Dunn's pour données appariées a été utilisé.

Dans le modèle murin, pour les comparaisons multiples non appariées, une ANOVA suivie d'un post hoc de Tukey a été réalisé lorsque la distribution était normale alors qu'un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post hoc de Dunn's a été effectué pour les données non-paramétriques. En ce qui concerne les comparaisons deux à deux dans le modèle *in vivo*, un t-test non apparié a été utilisé en cas de distribution normale et un test de Mann-Whitney a été appliqué lorsque les données ne respectaient pas la normalité.

La significativité statistique des résultats a été déterminée selon les seuils suivant :
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RÉSULTATS

1. Effet du TGF- β sur l'expression des marqueurs d'EMT, de fibrose et de CEMIP

Afin d'évaluer l'effet du TGF- β sur l'activation des fibroblastes et sur l'expression de CEMIP, des fibroblastes dermiques issus de peau humaine ainsi qu'une lignée cellulaire de fibroblastes (HDF) ont été stimulés par le TGF- β à différents temps de traitement. L'expression des marqueurs d'EMT, de fibrose et de CEMIP a été analysée par WB.

1.1. Lignée de fibroblastes dermiques HDF

Dans un premier temps, les HDF ont été stimulés à l'aide de TGF- β pendant 2, 5 et 7 jours. Les expressions de la fibronectine, de l' α -SMA, de la β -Caténine, de la Vimentine et de la périostine ont été analysées par WB. L'expression de la fibronectine est significativement augmentée après 2 et 5 jours de traitement au TGF- β (* $p < 0,05$) (*Figure 9A*). Une augmentation significative de l'expression de l' α -SMA est observée dans les cellules stimulées par rapport aux cellules contrôles quel que soit le temps de stimulation (* $p < 0,05$) (*Figure 9B*). A l'inverse, les niveaux d'expression de la β -caténine, de la vimentine et de la périostine ne présentent aucune différence significative entre les cellules non traitées et les cellules traitées indépendamment de la durée du traitement (*Figures 9C à 9E*).

En ce qui concerne CEMIP, la stimulation par le TGF- β pendant 2 jours montre une diminution significative de son expression par rapport à la condition contrôle (*** $p < 0,001$). Cependant, les stimulations de plus longues durées n'induisent aucune variation de son expression (*Figure 9F*).

Ces résultats montrent que la stimulation par le TGF- β induit une activation des HDF qui est caractérisée par une augmentation de certains marqueurs pro-fibrotiques. En effet, l'augmentation de l'expression de l' α -SMA et de la fibronectine indique une activation des fibroblastes vers un phénotype myofibroblastique. Ces derniers correspondent à des marqueurs précoces de l'induction de la fibrose. Le traitement au TGF- β pendant 2 jours provoque également une diminution de l'expression de CEMIP.

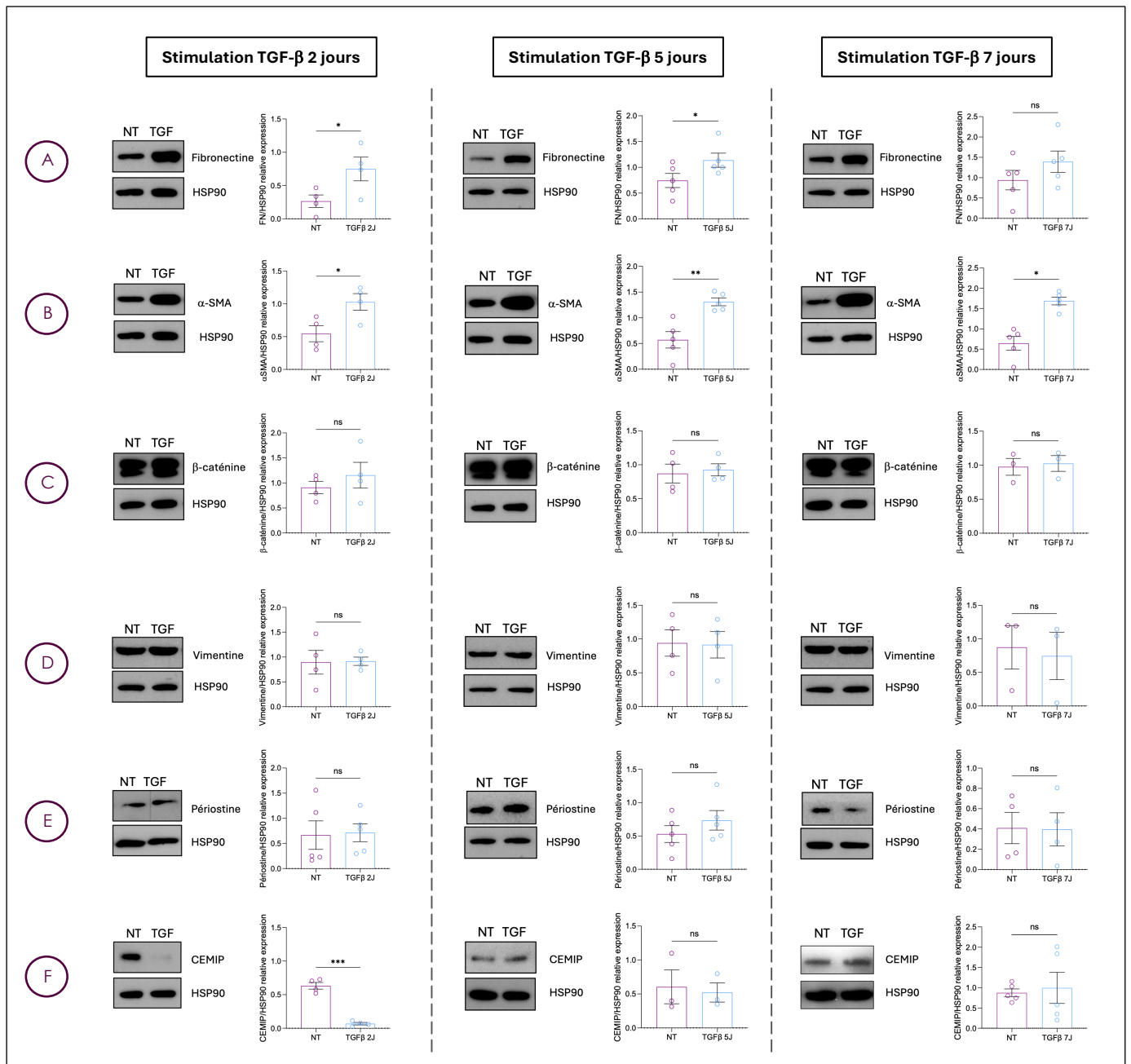


Figure 9 : Effet de la stimulation par le TGF-β pendant 2, 5 et 7 jours sur l'expression de marqueurs d'EMT, de fibrose et de CEMIP dans les HDF. Les HDF ont été stimulés avec du TGF-β pendant 2, 5 et 7 jours puis l'expression de différentes protéines a été analysée par WB. Des extraits protéiques provenant de différents passages des HDF ont été utilisés ($n = 3 - 5$). Les conditions traitées au TGF-β (TGF) sont comparées aux cellules non traitées (NT). WB représentatifs de **(A)** fibronectine, **(B)** α-SMA, **(C)** β-caténine, **(D)** vimentine, **(E)** périostine et **(F)** CEMIP et représentation graphique de leur quantification après normalisation avec la protéine ubiquitaire HSP90. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Cependant, une forte variabilité entre les différents échantillons de HDF est à noter. Les réplicats des WB sont présentés en annexe (*Annexe I*).

1.2. Fibroblastes dermiques primaires

De la même manière que pour les HDF, les fibroblastes dermiques primaires ont été stimulés par du TGF- β pendant 2, 5 et 7 jours. Le traitement par le TGF- β induit une augmentation de l'expression de la fibronectine et de l' α -SMA dans les fibroblastes primaires. Toutefois, cette augmentation n'atteint la significativité statistique qu'après 5 jours de traitement (* $p < 0,05$) (*Figures 10A et 10B*).

Une augmentation non significative est observée pour la β -caténine après 2 jours de traitement. Puis, son expression reste relativement constante au cours des stimulations plus longues (*Figure 10C*). Les niveaux d'expression de la vimentine et de la périostine restent inchangés entre les fibroblastes non traités et les fibroblastes stimulés (*Figures 10D et 10E*).

Après 2 jours de stimulation au TGF- β , une diminution significative de l'expression de CEMIP est observée dans la condition traitée (* $p < 0,05$). De plus, son expression diminue de manière encore plus significative après une stimulation de 5 jours (** $p < 0,001$) (*Figure 10F*).

Une variabilité inter-individuelle importante est à mettre en évidence. Les différents réplicats effectués peuvent être retrouvés en annexe (*Annexe I*).

2. Impact du milieu conditionné de cellules endothéliales en EndoMT sur les marqueurs d'EMT, de fibrose et CEMIP

Les MC de cellules endothéliales en EndoMT, suite à une stimulation par l'IL-1 β et le TGF- β , ont été appliqués sur les HDF et les fibroblastes primaires afin d'étudier l'effet paracrine des cellules endothéliales sur la prolifération cellulaire ainsi que sur l'expression des marqueurs d'EMT, de fibrose et sur l'expression de CEMIP par les fibroblastes.

2.1. Effet du milieu conditionné sur la prolifération des fibroblastes

La prolifération des HDF et des fibroblastes dermiques primaires a été évaluée après stimulation par le sécrétome des cellules endothéliales stimulées par IL-1 β et TGF- β pendant 1, 2 et 3 jours.

Après deux jours de traitement, une augmentation significative de la prolifération est observée dans les HDF stimulés par les MC de 2 jours par rapport aux cellules non traitées (* $p < 0,05$) (*Figure 11A*). Après sept jours de traitement, seul le sécrétome des cellules endothéliales traitées pendant 1 jour induit une augmentation significative de la prolifération des HDF, supérieure à deux fois celle observée dans la condition non traitée (* $p < 0,05$) (*Figure 11B*).

Dans les fibroblastes primaires issus de peau humaine traités par les MC stimulés pendant 1 jour, une variation significative de la prolifération est observée après deux jours de traitement (* $p < 0,05$) (*Figure 11C*). Après sept jours, une augmentation statistiquement significative de la prolifération est identifiée dans les fibroblastes stimulés par les MC activés pendant 1 et 2 jours, supérieure au double de la prolifération des cellules contrôles (* $p < 0,05$) (*Figure 11D*).

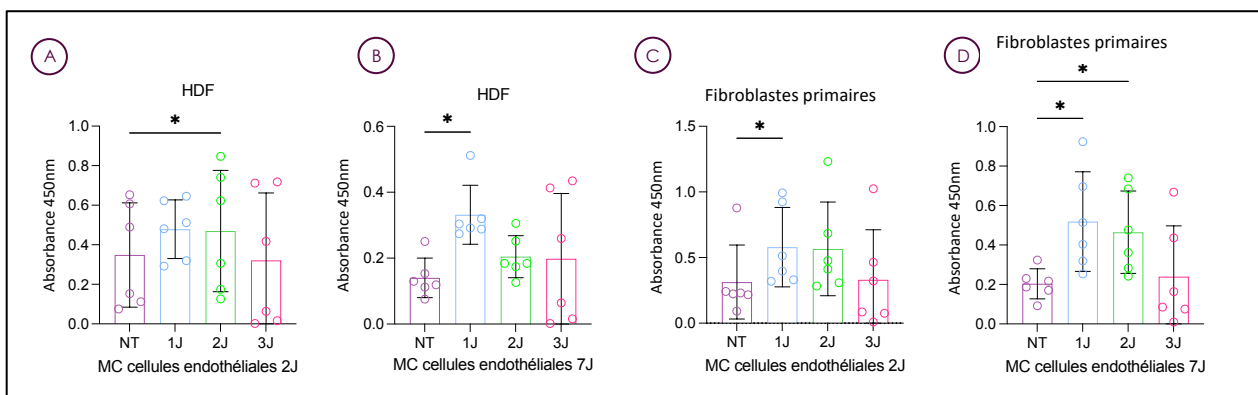


Figure 11 : Effet du sécrétome des cellules endothéliales stimulées sur la prolifération des fibroblastes dermiques. La prolifération des HDF et des fibroblastes dermiques primaires a été évaluée après 2 et 7 jours de traitement des différents milieux conditionnés (MC) de cellules endothéliales stimulées par IL-1 β et TGF- β pendant 1J, 2J et 3J ($n = 6$). La condition non traitée (NT) est utilisée comme contrôle. **(A)** Prolifération des HDF stimulés pendant 2J. **(B)** Prolifération des HDF stimulés pendant 7J. **(C)** Prolifération des fibroblastes issus de peau humaine stimulés pendant 2J. **(D)** Prolifération des fibroblastes issus de peau humaine stimulés pendant 7J. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.2. Effet du milieu conditionné sur la viabilité des fibroblastes

Afin de s'assurer que l'augmentation de la prolifération cellulaire ne soit pas liée à une différence de viabilité cellulaire, des tests de viabilité ont été réalisés. Les résultats montrent que les différents MC n'affectent pas significativement la viabilité des HDF (*Figures 12A et 12B*) et des fibroblastes primaires (*Figures 12D et 12E*).

En revanche, le traitement BAY provoque une diminution quasi complète du signal MTS, cela indique une perte statistiquement significative de la viabilité cellulaire (* $p < 0,05$ pour les HDF et ** $p < 0,01$ pour les fibroblastes primaires) (*Figures 12C et 12F*). Cette condition représente un contrôle positif qui démontre la sensibilité du test à détecter la cytotoxicité.

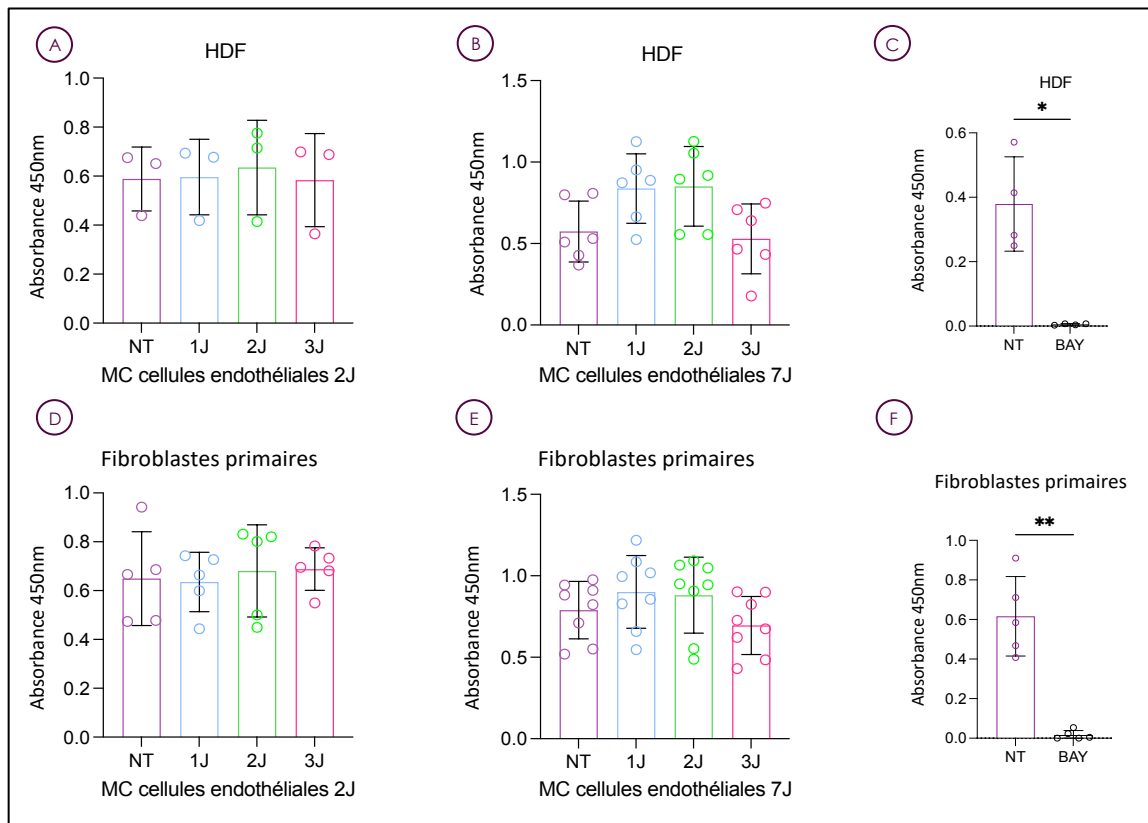


Figure 12 : Effet du sécrétome des cellules endothéliales stimulées sur la viabilité des fibroblastes. La viabilité des HDF et des fibroblastes primaires issus de peau humaine a été étudiée après 2 et 7 jours de traitement des différents milieux conditionnés (MC) de cellules endothéliales stimulées par IL-1 β et TGF- β pendant 1J, 2J et 3J ($n = 3 - 8$). La condition non traitée (NT) est utilisée comme contrôle. **(A)** Viabilité des HDF stimulés pendant 2J. **(B)** Viabilité des HDF stimulés pendant 7J. **(C)** Contrôle de cytotoxicité. **(D)** Viabilité des fibroblastes issus de peau humaine stimulés pendant 2J. **(E)** Viabilité des fibroblastes issus de peau humaine stimulés pendant 7J. **(F)** Contrôle de cytotoxicité. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.3. Effet du milieu conditionné sur les HDF

L'effet paracrine des cellules endothéliales en EndoMT sur l'expression des marqueurs d'EMT et de fibrose ainsi que sur l'expression de CEMIP par les fibroblastes a ensuite été analysé par WB. Les MC n'ont pas d'effet significatif sur l'expression de la fibronectine, de l' α -SMA, de la β -caténine et de la périostine, malgré une légère diminution de l' α -SMA après sept jours de traitement (*Figures 13A à 13C et 13E*). Seule l'expression de la vimentine est significativement diminuée après sept jours de stimulation par le MC provenant de cellules endothéliales en EndoMT après 2 jours d'activation (* $p < 0,05$) (*Figure 13D*).

Enfin, l'expression de CEMIP reste constante lors du traitement pendant deux jours. Cependant, après sept jours de stimulation, une augmentation significative de l'expression de CEMIP est observée lorsque le MC est activé pendant 1 jour (* $p < 0,05$) (*Figure 13F*).

Ces résultats suggèrent que les MC des cellules endothéliales en EndoMT n'induisent pas d'effet notable sur les marqueurs d'EMT et de fibrose, ni sur l'expression de CEMIP après deux jours de stimulation des HDF. Après une stimulation prolongée, certains marqueurs protéiques semblent diminuer (l' α -SMA et la vimentine) alors que l'expression de CEMIP augmente.

Une forte variabilité entre les différents échantillons est à souligner. L'ensemble des WB effectués se trouve en annexe (*Annexe II*).

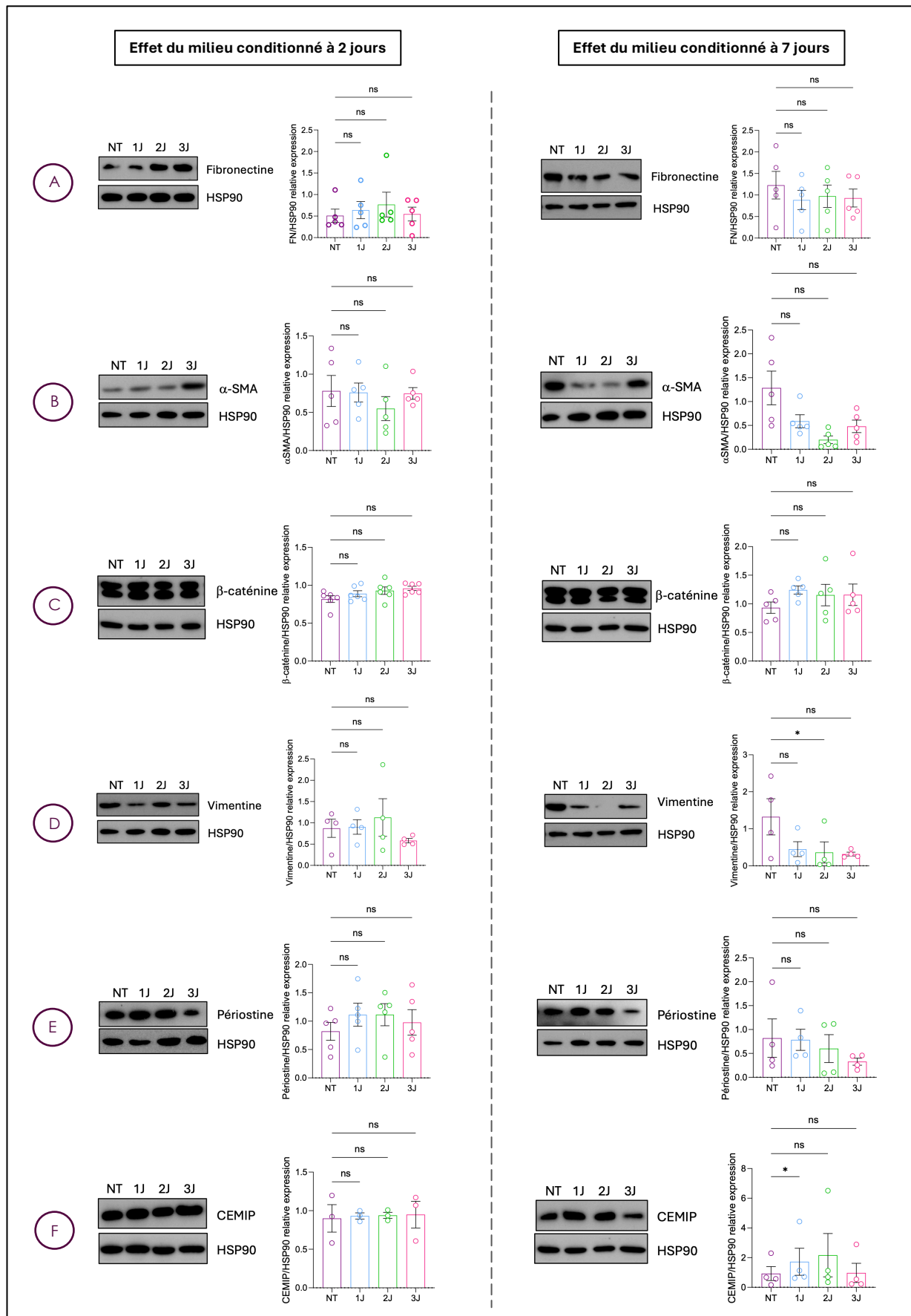


Figure 13 : Effet de la stimulation des HDF via les milieux conditionnés de cellules endothéliales. Les HDF ont été traités pendant 2 et 7 jours avec des milieux issus de cellules endothéliales stimulés pendant 1, 2 ou 3 jours. L'expression des différentes protéines a été analysée par WB à partir des lysats cellulaires ($n = 3 - 6$). La condition non traitée (NT) est utilisée comme contrôle. WB représentatifs de **(A)** fibronectine, **(B)** α -SMA, **(C)** β -caténine, **(D)** vimentine, **(E)** périostine et **(F)** CEMIP et représentation graphique de leur quantification après normalisation avec la protéine ubiquitaire HSP90. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.4. Effet du milieu conditionné sur les fibroblastes dermiques primaires

La même expérience a été réalisée sur des fibroblastes dermiques primaires. Les expressions de la fibronectine et de la β -caténine ne varient pas entre les fibroblastes traités et les fibroblastes non traités quelle que soit la durée de la stimulation par les MC (*Figures 14A et 14C*).

Après deux jours de traitement, le sécrétome issu de cellules endothéliales stimulées pendant 2 jours induit une diminution significative de l'expression de l' α -SMA dans les fibroblastes dermiques primaires (** $p < 0,01$). En revanche, les autres conditions n'entraînent pas de variation significative de l'expression de l' α -SMA. Après sept jours de stimulation, une diminution non significative de l' α -SMA est observée dans les fibroblastes (*Figure 14B*).

La vimentine ne varie pas significativement après un traitement de deux ou sept jours bien que son expression semble diminuer après sept jours de stimulation (*Figure 14D*). D'un autre côté, la périostine reste globalement constante quelle que soit la durée du conditionnement des cellules endothéliales et quelle que soit la durée du traitement (*Figure 14E*).

Contrairement aux HDF, deux jours de stimulation ont induit une diminution significative de l'expression de CEMIP lorsque les cellules sont traitées avec des MC issus des cellules endothéliales stimulées pendant 1 et 3 jours par l'IL-1 β et le TGF- β (** $p < 0,01$). En revanche, après 2 jours de stimulation des cellules endothéliales, une diminution non significative de CEMIP est observée. Suite à un traitement de longue durée, l'analyse de CEMIP révèle une expression variable entre les donneurs, sans modification significative pour les deux premières conditions (1J et 2J). Cependant, le MC de 3 jours entraîne une diminution significative de l'expression de CEMIP par rapport à la condition contrôle (* $p < 0,05$) (*Figure 14F*).

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence une variabilité inter-individuelle importante et tous les WB réalisés sont disponibles en annexe (*Annexe III*).

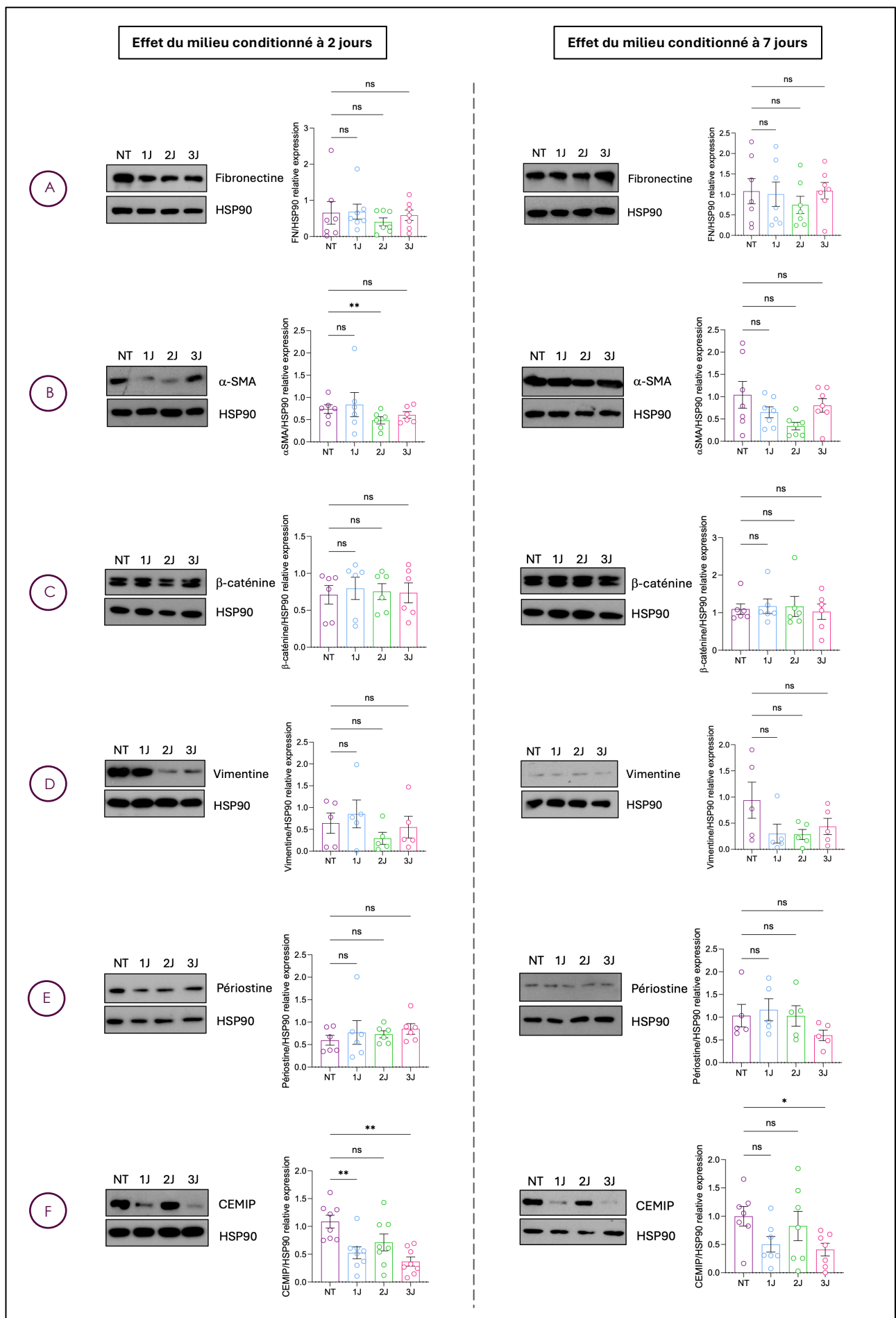


Figure 14 : Effet du sécrétome des cellules endothéliales en EndoMT sur les fibroblastes primaires. Des fibroblastes dermiques primaires ont été traités pendant 2 et 7 jours avec des milieux conditionnés (MC) provenant de cellules endothéliales stimulés par le TGF- β et l'IL-1 β pendant 1, 2 ou 3 jours. L'expression des différentes protéines a été analysée par WB à partir des lysats cellulaires ($n = 5 - 8$). La condition non traitée (NT) est utilisée comme contrôle. WB représentatifs de **(A)** fibronectine, **(B)** α -SMA, **(C)** β -caténine, **(D)** vimentine, **(E)** périostine et **(F)** CEMIP et représentation graphique de leur quantification après normalisation avec la protéine ubiquitaire HSP90. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3. Rôle de CEMIP dans le développement de la sclérodermie cutanée induite par HOCl

Afin d'étudier le rôle de CEMIP dans la SSc, des souris femelles C57BL/6 déficientes pour CEMIP (KO CEMIP) ont été utilisées dans un modèle murin de SSc induit par l'HOCl. Les souris ont été réparties en quatre groupes distincts : WT contrôles, WT SSc, KO contrôles et KO SSc. Les groupes contrôles ont reçu des injections quotidiennes de NaCl, tandis que les groupes traités ont reçu des injections quotidiennes d'HOCl. Afin d'étudier la phase inflammatoire du modèle, un premier groupe a reçu des injections pendant 1 semaine. Pour étudier la phase de fibrose, un deuxième groupe a reçu des injections pendant 6 semaines (*Figure 15*). Cela correspond donc à huit groupes expérimentaux distincts (*Tableau 6*).

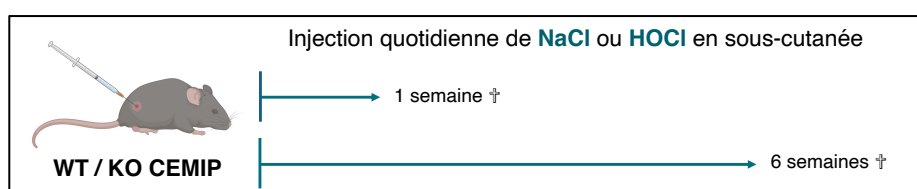


Figure 15 : Ligne du temps du modèle murin expérimental.

3.1. Analyse de l'épaisseur dermique

Afin d'évaluer le rôle de CEMIP dans la phase fibrosante tardive de la SSc induite par l'HOCl, des analyses histologiques à l'HE ont été réalisées sur la peau des souris après 6 semaines d'injections (*Figure 16A*) et l'épaisseur du derme a été quantifiée (*Figure 16B*). Comme attendu, l'épaisseur dermique est significativement augmentée chez les souris WT traitées par l'HOCl (WT SSc) par rapport aux souris WT traitées par le NaCl (WT Ctrl) (* $p < 0,05$) (*Figure 16C*). Cela permet de confirmer que l'injection d'HOCl a bien induit le phénotype attendu. Par contre aucune différence d'épaisseur dermique n'a été observée entre les souris WT SSc et les souris KO traitées à l'HOCl (KO SSc) (*Figure 16D*). De manière intéressante, l'épaisseur de la peau des souris KO SSc ne présentait pas d'augmentation par rapport au souris KO contrôles (KO Ctrl), suggérant que l'absence de CEMIP ne permet pas l'induction à l'HOCl (*Figure 16E*). Toutefois, une augmentation de l'épaisseur du derme a également été observée chez les souris KO Ctrl par rapport aux souris WT Ctrl (* $p < 0,05$) (*Figure 16F*). Cela suggère un possible phénotype basal lié à l'absence de CEMIP.

Ces observations ont soulevé des interrogations concernant le phénotype en condition basale des souris KO ainsi que sur la validité fonctionnelle du modèle d'inactivation de l'expression de CEMIP utilisé. Une validation complémentaire du modèle KO a donc été réalisée au niveau transcriptionnel et protéique. Ces analyses ont été effectuées au laboratoire de rhumatologie après ma période de stage.

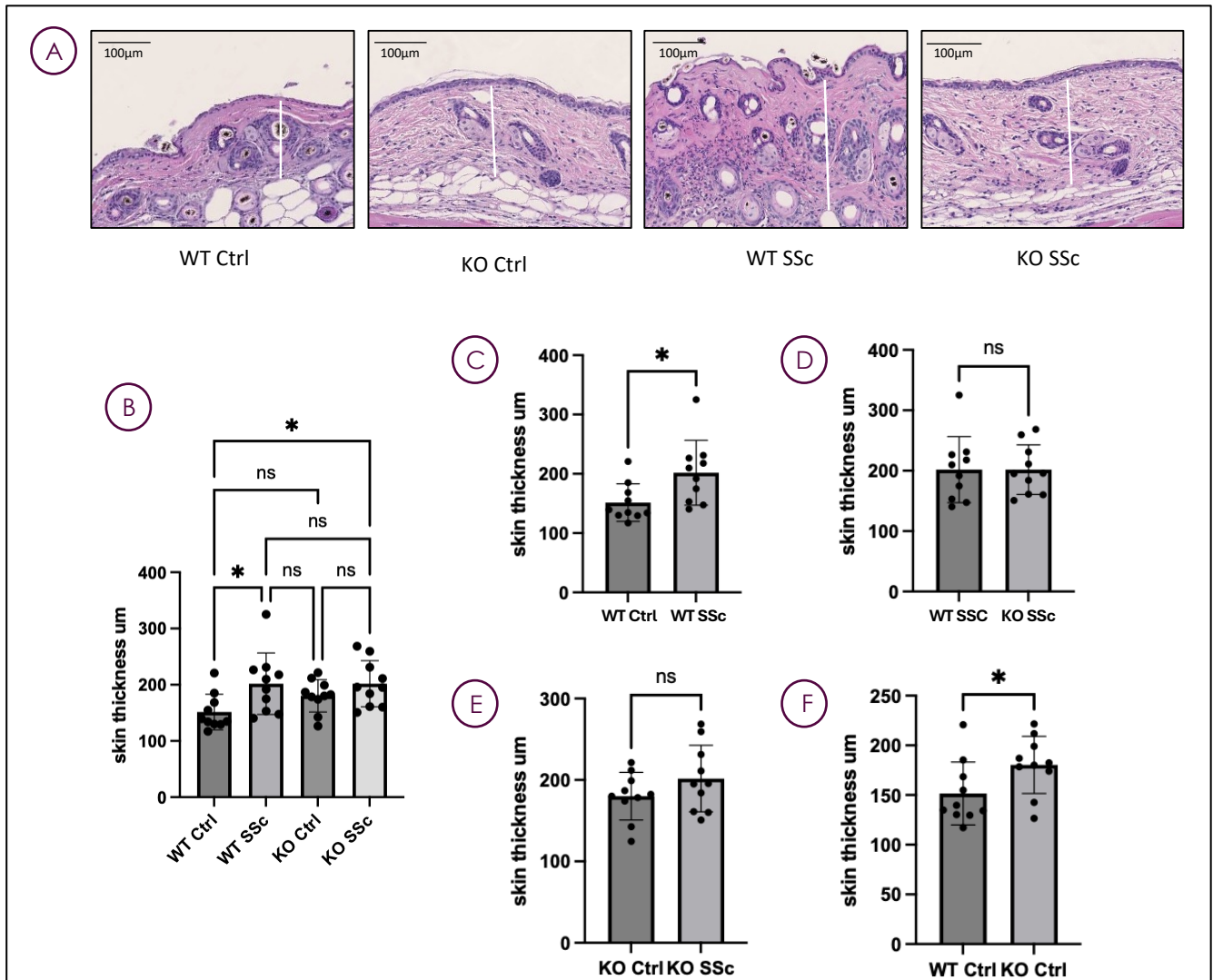


Figure 16 : Épaisseur du derme dans les souris WT et KO pour CEMIP après induction à l'HOCl. Les souris WT et KO pour le gène CEMIP ont été traitées par de l'HOCl pendant 6 semaines. Les souris traitées par du NaCl sont utilisées comme contrôles. **(A)** Image représentative pour chaque groupe de l'épaisseur du derme à partir d'une coloration à l'hématoxyline-éosine. **(B)** Comparaison de l'épaisseur dermique des 4 groupes de souris différents. **(C)** Comparaison de l'épaisseur dermique entre les souris WT Ctrl et WT SSc. **(D)** Comparaison de l'épaisseur dermique entre les souris WT SSc et KO SSc. **(E)** Comparaison de l'épaisseur dermique entre les souris KO Ctrl et KO SSc. **(F)** Comparaison de l'épaisseur dermique entre les souris WT Ctrl et KO Ctrl. La mesure a été réalisée au niveau du derme ($n = 10$ par groupe). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2. Validation au niveau transcriptionnel du modèle murin CEMIP KO

Afin de vérifier l'invalidation du gène CEMIP chez les souris KO utilisées dans notre étude, des analyses de RT-qPCR (PCR quantitative après transcription inverse) ont été effectuées sur des échantillons cutanés de souris WT et KO pour CEMIP. Deux régions distinctes du transcrit ont été analysées : les exons 4-5, ciblés par le système Cre-Lox, ainsi que les exons 9-10 qui se trouvent après la région délétée. Comme le montre la figure 17, l'expression des exons 4-5 est absente chez les souris KO contrairement aux souris WT (*Figure 17A*). Cela confirme l'élimination de la région ciblée. En revanche, les exons 9-10 demeurent détectables dans les souris KO (*Figure 17B*). Ces résultats suggèrent qu'un ARNm partiel de CEMIP est toujours exprimé dans la peau des souris KO malgré l'excision des exons ciblés.

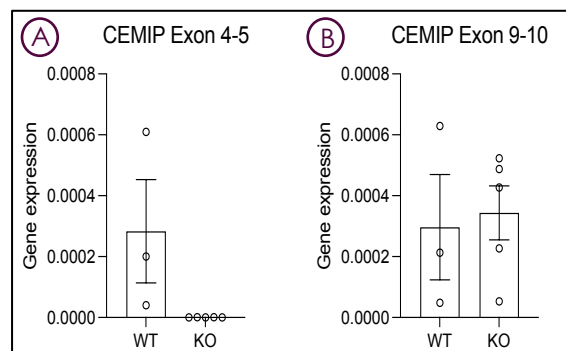


Figure 17 : Analyse transcriptionnelle de la déplétion du gène CEMIP dans le modèle murin. (A) Expression des exons 4-5 de CEMIP. **(B)** Expression des exons 9-10 de CEMIP.

3.3. Validation au niveau protéique du modèle murin CEMIP KO

Pour évaluer si la persistance du transcrit (exons 9-10) mise en évidence par RT-qPCR s'accompagnait d'une expression protéique résiduelle, des analyses par WB ont été réalisées à l'aide d'un anticorps dirigé contre CEMIP qui reconnaît une région centrale de la protéine située en dehors de la séquence délétée (après les exons 4-5). De la même manière que pour les souris WT, la bande correspondant à CEMIP reste détectable dans les échantillons de peau des souris KO CEMIP (*Figure 18A*). La spécificité de l'anticorps a été confirmée sur une lignée d'HDF après délétion par un siRNA (small interfering RNA) ciblé (*Figure 18B*). Ces résultats indiquent que l'excision des exons 4-5 n'entraîne pas de perte du signal protéique détecté par cet anticorps. Cependant, le WB ne permet pas de déterminer si ce signal correspond à la protéine CEMIP complète ou à une forme protéique alternative conservant l'épitope reconnu par l'anticorps. En

l'absence de validation claire de l'extinction protique de CEMIP dans ce modèle murin, les analyses complémentaires du modèle de SSc induit par l'HOCl n'ont pas été poursuivies.

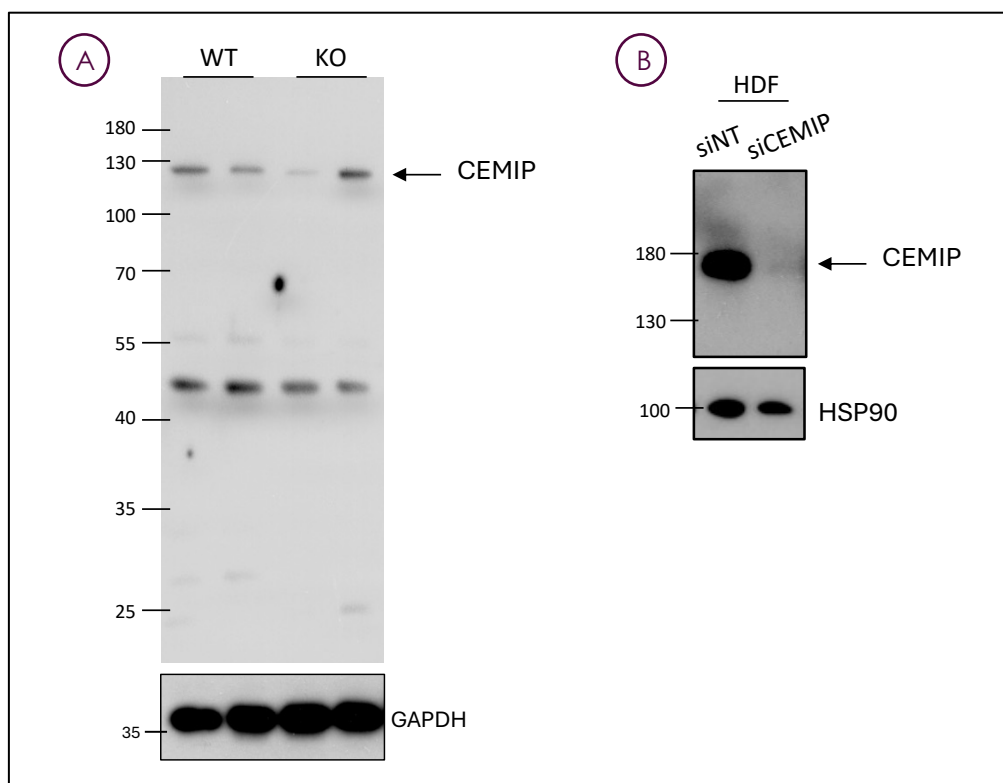


Figure 18 : Analyse protéique de la déplétion du gène CEMIP dans le modèle murin. (A) Expression de CEMIP dans les souris sauvages (WT) et dans les souris knock-out pour CEMIP (KO). (B) Analyse de la spécificité de l'anticorps dirigé contre CEMIP grâce à un siRNA.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Cette étude avait pour objectif d'explorer le rôle potentiel de CEMIP dans les mécanismes fibrosants impliqués dans la SSc. Plus particulièrement, nous avons étudié la modulation de son expression dans différents contextes pro-fibrotiques, son lien avec l'activation fibroblastique induite par des facteurs dérivés de cellules endothéliales engagées dans l'EndoMT, ainsi que l'impact de son invalidation dans un modèle murin de SSc induite par l'acide hypochloreux. Les résultats obtenus montrent que les différents modèles utilisés reproduisent partiellement certaines caractéristiques de l'activation fibroblastique et suggèrent une implication potentielle de CEMIP dans les processus de remodelage tissulaire associés à la fibrose.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le TGF- β afin d'induire un phénotype fibrotique dans la lignée cellulaire de HDF ainsi que dans des fibroblastes dermiques primaires humains. Les résultats obtenus montrent une augmentation de l' α -SMA et de la fibronectine, en particulier dans les HDF après 2 et 5 jours d'induction par le TGF- β . La même tendance est observée dans les fibroblastes primaires. Ces observations sont cohérentes avec la littérature qui décrit le TGF- β comme le principal médiateur pro-fibrosant impliqué dans l'activation des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes (86). L'augmentation de la fibronectine est notamment considérée comme un événement précoce (87), tandis que l'induction de l' α -SMA traduit l'acquisition progressive d'un phénotype contractile associé à l'activation fibroblastique (88–92). Ainsi, ces résultats suggèrent que le TGF- β est capable d'induire, dans nos modèles, une réponse compatible avec la mise en place d'un état pro-fibrotique. En revanche, aucune variation nette de l'expression de la β -caténine, de la périostine et de la vimentine n'a été observée dans les deux types cellulaires. Cette absence de réponse pourrait suggérer que l'activation du programme pro-fibrotique reste incomplète dans notre modèle. Cette réponse partielle pourrait être liée à l'absence ou l'insuffisance de voies coopératives nécessaires à l'engagement du programme fibrotique complet, telle que la signalisation Wnt/ β -caténine (93). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les conditions de stimulation utilisées dans cette étude ne permettent pas une différenciation myofibroblastique complète. Bien que le TGF- β soit considéré comme un inducteur central de fibrose, l'activation complète des myofibroblastes dépend également de signaux mécaniques issus de l'environnement cellulaire, notamment la rigidité de la MEC (94). Afin d'obtenir une activation plus marquée, il serait donc intéressant de modifier les conditions

expérimentales, par exemple en ajustant la durée ou la concentration de stimulation au TGF- β , en testant d'autres combinaisons de médiateurs pro-fibrosants ou encore en utilisant des matrices rigides mimant un environnement fibrotique.

Les différences observées entre les HDF et les fibroblastes primaires méritent également d'être soulignées. Globalement, les résultats semblent plus marqués dans la lignée cellulaire HDF que dans les cellules primaires. Cela pourrait s'expliquer notamment par la grande hétérogénéité des cellules primaires. Bien que ces deux types cellulaires soient issus du derme total et peuvent donc contenir les quatre sous-populations de fibroblastes identifiées par séquençage d'ARN à cellule unique (single-cell RNA-seq) : sécrétoire-papillaire, sécrétoire-réticulaire, pro-inflammatoire et mésenchymateuse (95), leur comportement *in vitro* peut différer. En effet, les HDF commerciales subissent un processus d'amplification industriel standardisé susceptible de favoriser une population cellulaire plus homogène. À l'inverse, les fibroblastes primaires humains sont isolés à partir de biopsies de taille restreinte. Cela conserve une forte hétérogénéité inter-individuelle et le ratio derme papillaire et réticulaire dépend fortement de la profondeur du prélèvement (96). Cette variabilité pourrait expliquer une plus grande dispersion des résultats comparés aux HDF.

Afin de mieux reproduire les interactions cellulaires impliquées dans la SSc, nous avons ensuite étudié l'effet de MC issus de cellules endothéliales activées. Les cellules endothéliales jouent un rôle central dans les étapes précoces de la maladie et participent activement à la communication avec les fibroblastes par la libération de nombreux médiateurs solubles (97,98). Dans ce contexte, nous nous attendions à observer une activation fibroblastique induite par le sécrétome endothélial. Les résultats obtenus montrent effectivement que les MC influencent le comportement des fibroblastes. Toutefois, cela se limite à leur capacité proliférative. En effet, une augmentation de la prolifération a été observée dans les HDF ainsi que dans les fibroblastes dermiques primaires après exposition aux MC stimulés pendant 24 ou 48 heures. Nos résultats concordent avec la littérature où les auteurs démontrent que les cellules endothéliales sécrètent des facteurs capables d'augmenter la prolifération des fibroblastes (70).

Cependant, contrairement à notre hypothèse initiale et à certaines observations rapportées dans la littérature, les MC n'ont pas induit d'augmentation claire des marqueurs d'EMT et de fibrose étudiés. En effet, il a été montré que les surnageants des MVEC (microvascular endothelial cells) provenant de patients SSc entraînent une activation des fibroblastes. En libérant des médiateurs tels que l'ET-1 et le CTGF, les cellules endothéliales stimulent le programme fibrotique des fibroblastes grâce à la voie du TGF- β /Smad (99).

Cela mène les fibroblastes à se différencier en myofibroblastes avec une surexpression de l' α -SMA, de la vimentine, de la fibronectine et du collagène de type I (99,100). Toutefois, contrairement à ces données, nos expériences montrent que l'expression de ces marqueurs reste globalement stable, voire tend à diminuer après une stimulation de courte ou de longue durée par le MC quel que soit le type cellulaire. Ces résultats suggèrent que le MC des cellules endothéliales activées module la prolifération des fibroblastes sans induire de différenciation myofibroblastique, indiquant un rôle possible dans les étapes précoces du remodelage tissulaire plutôt que dans l'activation fibrotique complète. Cette divergence avec la littérature pourrait être liée aux conditions d'activation utilisées pour les cellules endothéliales.

Après avoir caractérisé les effets des différents stimuli sur l'activation fibroblastique, nous avons cherché à déterminer comment l'expression de CEMIP était modulée dans ces différents contextes pro-fibrosants. Les données de la littérature montrent que l'expression de CEMIP augmente ou diminue en réponse au TGF- β en fonction de la durée de stimulation et du type cellulaire (35,48). Cette variabilité s'explique notamment par l'activation différentielle des voies Smad2/3 et Smad1/5 du TGF- β selon le contexte cellulaire et les conditions expérimentales (48,101,102). Toutefois, des travaux du laboratoire ont montré que la stimulation de cellules arthrosiques et des HDF au TGF- β pendant 7 jours induisait une augmentation de l'expression de CEMIP (1,35,48). De plus, dans un modèle de fibrose hépatique utilisant des cellules stellaires, la stimulation par le TGF- β induit une augmentation dose-dépendante de l'expression de CEMIP (103). Contrairement à notre hypothèse initiale, ni le TGF- β ni le MC de cellules endothéliales activées n'ont induit l'expression de CEMIP dans les fibroblastes. Au contraire, une diminution de son expression a été observée au temps court de stimulation par le TGF- β dans les 2 types cellulaires et par les MC à deux et sept jours dans les fibroblastes dermiques primaires. Ces résultats suggèrent que CEMIP ne constitue pas une cible directe de l'activation fibroblastique induite par ces stimuli dans nos modèles expérimentaux. Ils confirment également que la régulation de CEMIP dépend fortement du contexte cellulaire et de la durée de stimulation, comme cela a déjà été rapporté dans la littérature.

Afin d'explorer le rôle de CEMIP dans un contexte physiopathologique plus complexe, nous avons étudié les conséquences de son invalidation dans un modèle murin de SSc induite par l'HOCl. Ce modèle est couramment utilisé afin de reproduire plusieurs caractéristiques de la maladie, notamment l'inflammation et la fibrose cutanée, la fibrose pulmonaire et les atteintes

vasculaires (82). Comme attendu, nous avons observé une augmentation de l'épaisseur du derme chez les souris WT SSc par rapport aux souris WT contrôles. Ce résultat confirme que le protocole utilisé permet de reproduire le phénotype attendu, en accord avec les observations précédemment réalisées au laboratoire (1). Bien que l'épaisseur dermique constitue un indicateur classique d'induction à l'HOCl, elle ne permet cependant pas à elle seule de caractériser l'ensemble du phénotype fibreux. D'autres paramètres tels que l'augmentation de la quantité de collagène, l'expression de l' α -SMA par les fibroblastes ou encore la présence d'un infiltrat inflammatoire sont nécessaires pour valider l'induction de la fibrose cutanée. L'observation la plus intéressante de cette étude concerne l'absence d'augmentation d'épaisseur dermique observée chez les souris KO SSc par rapport aux souris KO contrôles. Contrairement aux animaux WT, les souris déficientes pour CEMIP ne développent pas d'augmentation de l'épaisseur dermique dans les conditions étudiées. L'inactivation du gène CEMIP semble ainsi conférer un effet protecteur vis-à-vis de l'induction à l'HOCl. Cette observation est cohérente avec les données de la littérature attribuant à CEMIP un rôle dans le remodelage matriciel via la dégradation du HA (68). Néanmoins, une analyse d'autres marqueurs est nécessaire afin de mieux caractériser ce mécanisme. D'autre part, nous pouvons constater que les souris KO saines possèdent déjà à l'état basal une épaisseur dermique plus importante que les souris WT saines. Ce résultat inattendu pourrait s'expliquer par le rôle de CEMIP dans la dégradation du HA de haut poids moléculaire. En l'absence de CEMIP, une accumulation du HA pourrait induire une augmentation de l'épaisseur dermique. Toutefois, cette hypothèse reste à confirmer et nécessiterait une analyse quantitative du HA ainsi qu'une caractérisation de son poids moléculaire dans les tissus étudiés.

Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec prudence puisque la validation complète du modèle KO n'est actuellement pas finalisée. En effet, bien que les analyses transcriptionnelles aient confirmé l'excision des exons 4-5 ciblés par le système Cre-Lox, une expression résiduelle des exons 9-10 reste détectable. De plus, les premières analyses protéiques suggèrent la persistance d'une expression résiduelle de CEMIP chez les souris KO. Afin de confirmer ces observations, des RT-qPCR et des WB sont en cours sur l'ensemble de la cohorte de souris. Ces expériences permettront de déterminer si le modèle correspond à une inactivation partielle du gène pouvant expliquer certains phénotypes observés.

Enfin, le laboratoire a cherché à objectiver le phénotype observé dans les souris CEMIP KO décrit dans le papier de Shimoda et al. (45). Dans cette étude, les auteurs observent une diminution de 5% de la longueur des tibias et des fémurs des souris KO pour CEMIP âgées de huit

semaines. Afin de visualiser si nos souris KO possédaient également ce trouble de l'ostéogenèse, une microtomographie à rayons X (micro-CT) a été réalisée. Les résultats n'ont pas montré de différence de longueur des tibias et des fémurs chez les souris KO comparés aux souris WT.

Limites de l'étude

Cette étude présente plusieurs limitations qui doivent être prises en compte dans l'interprétation des résultats. Tout d'abord, nos résultats présentent une variabilité importante, ce qui limite la robustesse des interprétations et la possibilité de tirer des conclusions définitives. Cette variabilité est particulièrement marquée dans les fibroblastes primaires. Cette hétérogénéité reflète la variabilité biologique interindividuelle, ce qui constitue à la fois une limite expérimentale et un reflet plus fidèle de la complexité biologique humaine. De manière plus inattendue, une forte variabilité a également été observée dans les résultats obtenus avec les lignées d'HDF malgré le caractère plus standardisé des lignées commerciales. Cela pourrait s'expliquer par les conditions de culture et le nombre de passages ainsi que par la variabilité technique inhérente aux analyses par WB. Le faible nombre de donneurs et de réplicats représente également une limite de ce travail. La réalisation d'expériences sur un plus grand nombre d'échantillons permettrait de diminuer l'impact de la variabilité biologique et de renforcer la fiabilité des résultats obtenus. En effet, une taille d'échantillon plus importante permet de mieux distinguer les effets biologiques réels de la variabilité intrinsèque.

Par ailleurs, les analyses reposent principalement sur des mesures d'expression protéique par WB. Des approches complémentaires telles que l'immunofluorescence ciblant l' α -SMA aurait permis de confirmer l'activation myofibroblastique. De plus, une approche fonctionnelle (inhibition ou une surexpression de CEMIP) aurait permis d'établir un lien causal direct entre cette protéine et les phénomènes observés.

Enfin, l'étude *in vivo* repose uniquement sur la mesure de l'épaisseur dermique, un paramètre qui ne permet pas à lui seul de caractériser l'ensemble du phénotype fibrotique. D'autres paramètres auraient été nécessaires afin de caractériser plus précisément les altérations tissulaires. De plus, la validation incomplète du modèle KO constitue une limite majeure de cette étude car elle peut influencer l'interprétation des différences observées entre les groupes expérimentaux.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'explorer le rôle potentiel de CEMP ainsi que l'impact des interactions endothélio-fibroblastiques dans le contexte de la fibrose associée à la SSc. Les résultats obtenus confirment que le TGF- β induit une activation des fibroblastes caractérisée par une augmentation des marqueurs pro-fibrosants comme l' α -SMA et la fibronectine même si cette activation semble partielle dans les conditions expérimentales utilisées.

L'analyse des MC endothéliaux met en évidence l'existence d'un dialogue paracrine entre les cellules endothéliales et les fibroblastes. Cet effet paracrine permet la modulation de la prolifération fibroblastique mais n'induit pas de différenciation myofibroblastique marquée. Ces observations soulignent la complexité des interactions cellulaires impliquées dans la fibrose et suggèrent que l'activation des fibroblastes dépend probablement d'une combinaison de signaux inflammatoires, mécaniques et paracrines.

Concernant CEMIP, les résultats obtenus montrent une diminution de son expression dans les différents contextes pro-fibrosants étudiés *in vitro* contrairement à ce qui était attendu suite aux résultats précédents du laboratoire. En revanche, dans le modèle murin de SSc induite par l'acide hypochloreux, l'absence d'augmentation de l'épaisseur dermique observée chez les souris déficientes pour CEMIP suggère une implication potentielle de cette protéine dans les mécanismes de remodelage tissulaire associés à la fibrose. Toutefois, cette interprétation doit être considérée avec prudence en raison de la validation encore incomplète du modèle murin KO.

Dans l'ensemble, ce travail met en évidence l'intérêt d'étudier les interactions entre les cellules endothéliales, les fibroblastes et le remodelage de la matrice extracellulaire dans la physiopathologie de la SSc. Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués et d'évaluer le rôle potentiel de CEMIP dans cette pathologie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Deroyer C, al. CEMIP contributes to skin inflammation and fibrosis in systemic sclerosis. Manuscript under revision at Cell Death & Disease, 2026.
2. Lenderking WR, Ladd MK, Barnes N, Braverman J, Gasior M, Hofmann J, et al. Development of a conceptual model of early systemic sclerosis (scleroderma). *Orphanet J Rare Dis.* 19 août 2025;20(1):446. doi:10.1186/s13023-025-03917-8
3. Chiu YH, Van Dijk M, Goldschmeding R, Van Laar JM, De Vries-Bouwstra JK, Spierings J. Dermal cellular senescence and EndMT in patients with systemic sclerosis undergoing cyclophosphamide or aHSCT treatment. *Rheumatology.* 1 juin 2025;64(6):3957-63. doi:10.1093/rheumatology/keae660
4. Zheng L, Wu Q, Chen S, Wen J, Dong F, Meng N, et al. Development and validation of a new diagnostic prediction model of ENHO and NOX4 for early diagnosis of systemic sclerosis. *Front Immunol.* 29 janv 2024;15:1273559. doi:10.3389/fimmu.2024.1273559
5. Di Battista M, Barsotti S, Orlandi M, Lepri G, Codullo V, Della Rossa A, et al. One year in review 2021: systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 28 juill 2021;39(4):3-12. doi:10.55563/clinexprheumatol/izadb8
6. Correia AM, Campitiello R, Pizzorni C, Gotelli E, Sulli A, Paolino S, et al. Differences in nailfold capillaroscopy findings between limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis: a detailed analysis. *RMD Open.* juill 2025;11(3):e005716. doi:10.1136/rmdopen-2025-005716
7. Corallo C, Franci B, Lucani B, Montella A, Chirico C, Gonnelli S, et al. From microvasculature to fibroblasts: Contribution of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* mars 2015;28(1):93-103. doi:10.1177/0394632015572750
8. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airò P, Cozzi F, Carreira PE, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* oct 2010;69(10):1809-15. doi:10.1136/ard.2009.114264 PubMed PMID: 20551155.
9. Zanatta E, Huscher D, Ortolan A, Avouac J, Airò P, Balbir-Gurman A, et al. Phenotype of limited cutaneous systemic sclerosis patients with positive anti-topoisomerase I antibodies: data from the EUSTAR cohort. *Rheumatology.* 28 nov 2022;61(12):4786-96. doi:10.1093/rheumatology/keac188
10. Hoffmann-Vold AM, Fretheim H, Halse AK, Seip M, Bitter H, Wallenius M, et al. Tracking Impact of Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis in a Complete Nationwide Cohort. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 nov 2019;200(10):1258-66. doi:10.1164/rccm.201903-0486OC PubMed PMID: 31310156.
11. Gilbane AJ, Derrett-Smith E, Trinder SL, Good RB, Pearce A, Denton CP, et al. Impaired Bone Morphogenetic Protein Receptor II Signaling in a Transforming Growth Factor- β -Dependent Mouse Model of Pulmonary Hypertension and in Systemic Sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mars 2015;191(6):665-77. doi:10.1164/rccm.201408-1464OC
12. Stern EP, Unwin R, Burns A, Ong VH, Denton CP. Exploring molecular pathology of chronic kidney disease in systemic sclerosis by analysis of urinary and serum proteins. *Rheumatol Adv Pract.* 7 janv 2021;5(1):rkaa083. doi:10.1093/rap/rkaa083 PubMed PMID: 33604504; PubMed Central PMCID: PMC7878848.

13. Homer KL, Warren J, Karayev D, Khanna PP, Young A, Nagaraja V, et al. Performance of Anti-Topoisomerase I Antibody Testing by Multiple-Bead, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunodiffusion in a University Setting. *JCR J Clin Rheumatol.* avr 2020;26(3):115-8. doi:10.1097/RHU.0000000000000971
14. Han X, Wang X, Huang J, Yang J. Fibrosis mechanisms and updates in potential therapeutic targets in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* oct 2025;74:152811. doi:10.1016/j.semarthrit.2025.152811
15. De Almeida Chaves S, Porel T, Mounié M, Alric L, Astudillo L, Huart A, et al. Sine scleroderma, limited cutaneous, and diffused cutaneous systemic sclerosis survival and predictors of mortality. *Arthritis Res Ther.* déc 2021;23(1):295. doi:10.1186/s13075-021-02672-y
16. Sadatpour O, Azizan A, Kavosi H, Vodjani M, Farhadi E, Mahmoudi M. Systemic sclerosis, main culprits and involved signaling pathways. *Inflamm Res.* déc 2025;74(1):158. doi:10.1007/s00011-025-02126-0
17. Volkman ER, Andréasson K, Smith V. Systemic sclerosis. *The Lancet.* janv 2023;401(10373):304-18. doi:10.1016/S0140-6736(22)01692-0
18. Hinchcliff M, Varga J. Systemic Sclerosis/Scleroderma: A Treatable Multisystem Disease. *Syst Scler.*
19. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primer.* 23 avr 2015;1(1):15002. doi:10.1038/nrdp.2015.2
20. Komura K. The clinical utility of autoantibodies in systemic sclerosis: a review with a focus on cohort differences and standardization. *Front Immunol.* 24 oct 2025;16:1691988. doi:10.3389/fimmu.2025.1691988
21. Binda M, Ortolan A, Moccaldi B, Salvato M, Cuberli A, Padoan R, et al. Phenotype of diffuse cutaneous systemic sclerosis patients with positive anticentromere antibodies: A systematic literature review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* févr 2025;70:152606. doi:10.1016/j.semarthrit.2024.152606
22. Derrett-Smith EC, Martyanov V, Chighizola CB, Moinszadeh P, Campochiaro C, Khan K, et al. Limited cutaneous systemic sclerosis skin demonstrates distinct molecular subsets separated by a cardiovascular development gene expression signature. *Arthritis Res Ther.* déc 2017;19(1):156. doi:10.1186/s13075-017-1360-7
23. Desai R, Chawla H, Larin K, Assassi S. Methods for objective assessment of skin involvement in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* nov 2023;35(6):301-8. doi:10.1097/BOR.0000000000000968
24. Medsger TA, Benedek TG. History of skin thickness assessment and the Rodnan skin thickness scoring method in systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord.* juin 2019;4(2):83-8. doi:10.1177/2397198318823122
25. Del Galdo F, Lescoat A, Conaghan PG, Bertoldo E, Čolić J, Santiago T, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: 2023 update. *Ann Rheum Dis.* janv 2025;84(1):29-40. doi:10.1136/ard-2024-226430
26. Pope JE, Denton CP, Johnson SR, Fernandez-Codina A, Hudson M, Nevskaya T. State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* avr 2023;19(4):212-26. doi:10.1038/s41584-023-00909-5

27. Wang X, Wu X, Tan B, Zhu L, Zhang Y, Lin L, et al. Allogeneic CD19-targeted CAR-T therapy in patients with severe myositis and systemic sclerosis. *Cell*. sept 2024;187(18):4890-4904.e9. doi:10.1016/j.cell.2024.06.027
28. Auth J, Müller F, Völkl S, Bayerl N, Distler JHW, Tur C, et al. CD19-targeting CAR T-cell therapy in patients with diffuse systemic sclerosis: a case series. *Lancet Rheumatol*. févr 2025;7(2):e83-93. doi:10.1016/S2665-9913(24)00282-0
29. Sanchez B, Li L, Dulong J, Aimond G, Lamartine J, Liu G, et al. Impact of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells on Primary Dermal Fibroblasts in Response to Inflammatory Stress. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:44. doi:10.3389/fcell.2019.00044 PubMed PMID: 31001530; PubMed Central PMCID: PMC6456658.
30. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 15 juin 1989;161(2):851-8. doi:10.1016/0006-291x(89)92678-8 PubMed PMID: 2735925.
31. Distler O, Distler JHW, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J, et al. Uncontrolled Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors Leads to Insufficient Skin Angiogenesis in Patients With Systemic Sclerosis. *Circ Res*. 9 juill 2004;95(1):109-16. doi:10.1161/01.RES.0000134644.89917.96
32. Chen PY, Qin L, Tellides G, Simons M. Fibroblast growth factor receptor 1 is a key inhibitor of TGF β signaling in the endothelium. *Sci Signal*. 23 sept 2014;7(344):ra90. doi:10.1126/scisignal.2005504 PubMed PMID: 25249657.
33. Akatsu Y, Takahashi N, Yoshimatsu Y, Kimuro S, Muramatsu T, Katsura A, et al. Fibroblast growth factor signals regulate transforming growth factor- β -induced endothelial-to-myofibroblast transition of tumor endothelial cells via Elk1. *Mol Oncol*. août 2019;13(8):1706-24. doi:10.1002/1878-0261.12504 PubMed PMID: 31094056; PubMed Central PMCID: PMC6670013.
34. Denton CP, Shi-wen X, Black CM, Pearson JD. Scleroderma Fibroblasts Show Increased Responsiveness to Endothelial Cell-Derived IL-1 and bFGF. *J Invest Dermatol*. mars 1997;108(3):269-74. doi:10.1111/1523-1747.ep12286455
35. Deroyer C, Poulet C, Paulissen G, Ciregia F, Malaise O, Plener Z, et al. CEMIP (KIAA1199) regulates inflammation, hyperplasia and fibrosis in osteoarthritis synovial membrane. *Cell Mol Life Sci*. mai 2022;79(5):260. doi:10.1007/s00018-022-04282-6
36. Rosendahl A, Schönborn K, Krieg T. Pathophysiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Kaohsiung J Med Sci*. mars 2022;38(3):187-95. doi:10.1002/kjm2.12505
37. Raja J, Denton CP. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. sept 2015;37(5):543-57. doi:10.1007/s00281-015-0511-7
38. Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 10 oct 2013;15(5):R151. doi:10.1186/ar4334
39. Fuschiotti P, Larregina AT, Ho J, Feghali-Bostwick C, Medsger TA. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. janv 2013;65(1):236-46. doi:10.1002/art.37706 PubMed PMID: 23001877; PubMed Central PMCID: PMC3535505.
40. Kim WU, Min SY, Cho ML, Hong KH, Shin YJ, Park SH, et al. Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res*. 7(1).

41. Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic Oligosaccharides of Hyaluronan Induce Multiple Signaling Pathways Affecting Vascular Endothelial Cell Mitogenic and Wound Healing Responses. *J Biol Chem.* oct 2002;277(43):41046-59. doi:10.1074/jbc.M109443200
42. Steen EH, Short WD, Li H, Parikh UM, Blum A, Templeman N, et al. Skin-specific knockdown of hyaluronan in mice by an optimized topical 4-methylumbelliferone formulation. *Drug Deliv.* janv 2021;28(1):422-32. doi:10.1080/10717544.2021.1886376
43. Bollyky PL, Bogdani M, Bollyky JB, Hull RL, Wight TN. The Role of Hyaluronan and the Extracellular Matrix in Islet Inflammation and Immune Regulation. *Curr Diab Rep.* oct 2012;12(5):471-80. doi:10.1007/s11892-012-0297-0
44. Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, et al. Chronic Ultraviolet B Irradiation Causes Loss of Hyaluronic Acid from Mouse Dermis Because of Down-Regulation of Hyaluronic Acid Synthases. *Am J Pathol.* nov 2007;171(5):1451-61. doi:10.2353/ajpath.2007.070136
45. Shimoda M, Yoshida H, Mizuno S, Hirozane T, Horiuchi K, Yoshino Y, et al. Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Controls Endochondral Ossification through Hyaluronan Metabolism. *Am J Pathol.* mai 2017;187(5):1162-76. doi:10.1016/j.ajpath.2017.01.005
46. Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan Fragments Stimulate Endothelial Recognition of Injury through TLR4. *J Biol Chem.* avr 2004;279(17):17079-84. doi:10.1074/jbc.M310859200
47. Schmaus A, Rothley M, Schreiber C, Möller S, Roßwag S, Franz S, et al. Sulfated hyaluronic acid inhibits the hyaluronidase CEMIP and regulates the HA metabolism, proliferation and differentiation of fibroblasts. *Matrix Biol.* 1 mai 2022;109:173-91. doi:10.1016/j.matbio.2022.04.001
48. Deroyer C, Charlier E, Neuville S, Malaise O, Gillet P, Kurth W, et al. CEMIP (KIAA1199) induces a fibrosis-like process in osteoarthritic chondrocytes. *Cell Death Dis.* 4 févr 2019;10(2):103. doi:10.1038/s41419-019-1377-8
49. Pinto MT, Covas DT, Kashima S, Rodrigues CO. Endothelial Mesenchymal Transition: Comparative Analysis of Different Induction Methods. *Biol Proced Online.* déc 2016;18(1):10. doi:10.1186/s12575-016-0040-3
50. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juin 1986;83(12):4167-71. doi:10.1073/pnas.83.12.4167 PubMed PMID: 2424019; PubMed Central PMCID: PMC323692.
51. Yan X, Liao H, Cheng M, Shi X, Lin X, Feng XH, et al. Smad7 Protein Interacts with Receptor-regulated Smads (R-Smads) to Inhibit Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/Smad Signaling. *J Biol Chem.* 1 janv 2016;291(1):382-92. doi:10.1074/jbc.M115.694281 PubMed PMID: 26555259; PubMed Central PMCID: PMC4697173.
52. Krieg T, Abraham D, Lafyatis R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(Suppl 2):S4. doi:10.1186/ar2188
53. Spataro S, Guerra C, Cavalli A, Sgrignani J, Sleeman J, Poulain L, et al. CEMIP (HYBID, KIAA1199): structure, function and expression in health and disease. *FEBS J.* août 2023;290(16):3946-62. doi:10.1111/febs.16600
54. Abe S, Usami S, Nakamura Y. Mutations in the gene encoding KIAA1199 protein, an inner-ear protein expressed in Deiters' cells and the fibrocytes, as the cause of nonsyndromic hearing loss. *J Hum Genet.* 1 nov 2003;48(11):564-70. doi:10.1007/s10038-003-0079-2

55. Duong HQ, Nemazanyy I, Rambow F, Tang SC, Delaunay S, Tharun L, et al. The Endosomal Protein CEMIP Links WNT Signaling to MEK1-ERK1/2 Activation in Selumetinib-Resistant Intestinal Organoids. *Cancer Res.* 15 août 2018;78(16):4533-48. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3149 PubMed PMID: 29915160.
56. Shostak K, Zhang X, Hubert P, Göktuna SI, Jiang Z, Klevernic I, et al. NF- κ B-induced KIAA1199 promotes survival through EGFR signalling. *Nat Commun.* 4 nov 2014;5(1):5232. doi:10.1038/ncomms6232
57. Xie G, Dong P, Chen H, Xu L, Liu Y, Ma Y, et al. Decreased expression of ATF3, orchestrated by β -catenin/TCF3, miR-17-5p and HOXA11-AS, promoted gastric cancer progression via increased β -catenin and CEMIP. *Exp Mol Med.* 1 nov 2021;53(11):1706-22. doi:10.1038/s12276-021-00694-9
58. Shiozawa J, De Vega S, Cilek MZ, Yoshinaga C, Nakamura T, Kasamatsu S, et al. Implication of HYBID (Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization) in Hyaluronan Degradation by Synovial Fibroblasts in Patients with Knee Osteoarthritis. *Am J Pathol.* mai 2020;190(5):1046-58. doi:10.1016/j.ajpath.2020.01.003
59. Yoshida H, Nagaoka A, Komiya A, Aoki M, Nakamura S, Morikawa T, et al. Reduction of hyaluronan and increased expression of HYBID (alias CEMIP and KIAA1199) correlate with clinical symptoms in photoaged skin. *Br J Dermatol.* juill 2018;179(1):136-44. doi:10.1111/bjd.16335 PubMed PMID: 29330857.
60. He Q yuan, Liu X hua, Li Q, Studholme DJ, Li X wen, Liang S ping. G8: a novel domain associated with polycystic kidney disease and non-syndromic hearing loss. *Bioinformatics.* 15 sept 2006;22(18):2189-91. doi:10.1093/bioinformatics/btl123
61. Guo J, Cheng H, Zhao S, Yu L. GG: A domain involved in phage LTF apparatus and implicated in human MEB and non-syndromic hearing loss diseases. *FEBS Lett.* 2006;580(2):581-4. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.076
62. Yoshida H, Nagaoka A, Nakamura S, Tobiishi M, Sugiyama Y, Inoue S. N-terminal signal sequence is required for cellular trafficking and hyaluronan-depolymerization of KIAA1199. *FEBS Lett.* 2014;588(1):111-6. doi:10.1016/j.febslet.2013.11.017
63. Liu J, Yan W, Han P, Tian D. The emerging role of KIAA1199 in cancer development and therapy. *Biomed Pharmacother.* juin 2021;138:111507. doi:10.1016/j.biopha.2021.111507
64. Evensen NA, Kuscu C, Nguyen HL, Zarrabi K, Dufour A, Kadam P, et al. Unraveling the Role of KIAA1199, a Novel Endoplasmic Reticulum Protein, in Cancer Cell Migration. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 18 sept 2013;105(18):1402-16. doi:10.1093/jnci/djt224
65. Usami S, Takumi Y, Suzuki N, Oguchi T, Oshima A, Suzuki H, et al. The localization of proteins encoded by *CRYM*, *KIAA1199*, *UBA52*, *COL9A3*, and *COL9A1*, genes highly expressed in the cochlea. *Neuroscience.* 12 juin 2008;From Cochlea to Cortex: Recent Advances in Auditory Neuroscience154(1):22-8. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.03.018
66. Garron ML, Cygler M. Uronic polysaccharide degrading enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* oct 2014;28:87-95. doi:10.1016/j.sbi.2014.07.012 PubMed PMID: 25156747.
67. Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, et al. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet.* mars 2002;30(3):259-69. doi:10.1038/ng833
68. Yoshida H, Nagaoka A, Kusaka-Kikushima A, Tobiishi M, Kawabata K, Sayo T, et al. KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc Natl Acad Sci.* 2 avr 2013;110(14):5612-7. doi:10.1073/pnas.1215432110

69. Yoshida H, Inoue S, Okada Y. New molecules indispensable for hyaluronan degradation, HYBID (CEMIP/KIAA1199) and TMEM2 (CEMIP2): Differential roles in physiological and pathological non-neoplastic conditions. *Proc Jpn Acad Ser B*. 11 juin 2025;101(6):317-38. doi:10.2183/pjab.101.021
70. Tan Y, Zhang M, Kong Y, Zhang F, Wang Y, Huang Y, et al. Fibroblasts and endothelial cells interplay drives hypertrophic scar formation: Insights from in vitro and in vivo models. *Bioeng Transl Med*. mars 2024;9(2):e10630. doi:10.1002/btm2.10630
71. Dong X, Yang Y, Yuan Q, Hou J, Wu G. High Expression of CEMIP Correlates Poor Prognosis and the Tumor Microenvironment in Breast Cancer as a Promisingly Prognostic Biomarker. *Front Genet*. 13 déc 2021;12:768140. doi:10.3389/fgene.2021.768140
72. Guo S, Guo Y, Chen Y, Cui S, Zhang C, Chen D. The role of CEMIP in cancers and its transcriptional and post-transcriptional regulation. *PeerJ*. 19 févr 2024;12:e16930. doi:10.7717/peerj.16930
73. Liu Y, Hu G, Li Y, Kong X, Yang K, Li Z, et al. Research on the biological mechanism and potential application of CEMIP. *Front Immunol*. 18 août 2023;14:1222425. doi:10.3389/fimmu.2023.1222425
74. Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. *The Lancet*. juill 2015;386(9991):376-87. doi:10.1016/S0140-6736(14)60802-3
75. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. oct 2016;388(10055):2023-38. doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8
76. Yang X, Qiu P, Chen B, Lin Y, Zhou Z, Ge R, et al. KIAA1199 as a potential diagnostic biomarker of rheumatoid arthritis related to angiogenesis. *Arthritis Res Ther*. 29 mai 2015;17(1):140. doi:10.1186/s13075-015-0637-y
77. Zhang W, Yin G, Zhao H, Ling H, Xie Z, Xiao C, et al. Secreted KIAA1199 promotes the progression of rheumatoid arthritis by mediating hyaluronic acid degradation in an ANXA1-dependent manner. *Cell Death Dis*. 20 janv 2021;12(1):102. doi:10.1038/s41419-021-03393-5
78. Soroosh A, Albeiroti S, West GA, Willard B, Fiocchi C, De La Motte CA. Crohn's Disease Fibroblasts Overproduce the Novel Protein KIAA1199 to Create Proinflammatory Hyaluronan Fragments. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. mai 2016;2(3):358-368.e4. doi:10.1016/j.jcmgh.2015.12.007
79. Raker VK, Kim YO, Haub J, Lorenz N, Schmidt T, Stegemann A, et al. Myeloid cell populations and fibrogenic parameters in bleomycin- and HOC I-induced fibrosis. *Exp Dermatol*. nov 2016;25(11):887-94. doi:10.1111/exd.13124
80. Błyszczuk P, Kozlova A, Guo Z, Kania G, Distler O. Experimental Mouse Model of Bleomycin-Induced Skin Fibrosis. *Curr Protoc Immunol*. sept 2019;126(1):e88. doi:10.1002/cpim.88
81. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal Model of Sclerotic Skin. I: Local Injections of Bleomycin Induce Sclerotic Skin Mimicking Scleroderma. *J Invest Dermatol*. avr 1999;112(4):456-62. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00528.x
82. Meng M, Tan J, Chen W, Du Q, Xie B, Wang N, et al. The Fibrosis and Immunological Features of Hypochlorous Acid Induced Mouse Model of Systemic Sclerosis. *Front Immunol*. 20 août 2019;10:1861. doi:10.3389/fimmu.2019.01861
83. Liang M, Lv J, Zou L, Yang W, Xiong Y, Chen X, et al. A modified murine model of systemic sclerosis: bleomycin given by pump infusion induced skin and pulmonary inflammation and fibrosis. *Lab Invest*. mars 2015;95(3):342-50. doi:10.1038/labinvest.2014.145

84. Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, et al. Selective Oxidation of DNA Topoisomerase 1 Induces Systemic Sclerosis in the Mouse. *J Immunol.* 1 mai 2009;182(9):5855-64. doi:10.4049/jimmunol.0803705
85. Pressé M. Regulation of Hyaluronic Acid in the Mouse Cochlea and Effect of Its Accumulation on the Hearing Function. Liège université; 2023.
86. Dolivo D, Larson S, Dominko T. Crosstalk between mitogen-activated protein kinase inhibitors and transforming growth factor- β signaling results in variable activation of human dermal fibroblasts. *Int J Mol Med.* 23 oct 2018. doi:10.3892/ijmm.2018.3949
87. Ignatz RA, Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* mars 1986;261(9):4337-45. doi:10.1016/S0021-9258(17)35666-1
88. Satish L, Gallo PH, Baratz ME, Johnson S, Kathju S. Reversal of TGF- β 1 stimulation of α -smooth muscle actin and extracellular matrix components by cyclic AMP in Dupuytren's - derived fibroblasts. 2011.
89. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. Matsudaira PT, éditeur. *Mol Biol Cell.* sept 2001;12(9):2730-41. doi:10.1091/mbc.12.9.2730
90. Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* mai 2004;18(7):816-27. doi:10.1096/fj.03-1273rev
91. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* juill 2012;18(7):1028-40. doi:10.1038/nm.2807
92. Hinz B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *J Invest Dermatol.* mars 2007;127(3):526-37. doi:10.1038/sj.jid.5700613
93. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun.* 13 mars 2012;3(1):735. doi:10.1038/ncomms1734
94. Hinz B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech.* 5 janv 2010;Special Issue on Cell Mechanobiology43(1):146-55. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.09.020
95. Deng CC, Hu YF, Zhu DH, Cheng Q, Gu JJ, Feng QL, et al. Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases. *Nat Commun.* 17 juin 2021;12(1):3709. doi:10.1038/s41467-021-24110-y
96. Ganier C, Rognoni E, Goss G, Lynch M, Watt FM. Fibroblast Heterogeneity in Healthy and Wounded Skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* juin 2022;14(6):a041238. doi:10.1101/cshperspect.a041238
97. Guidry C, Hohn S, Hook M. Endothelial cells secrete a factor that promotes fibroblast contraction of hydrated collagen gels. *J Cell Biol.* 1 févr 1990;110(2):519-28. doi:10.1083/jcb.110.2.519
98. Romano E, Rosa I, Fioretto BS, Manetti M. The contribution of endothelial cells to tissue fibrosis. *Curr Opin Rheumatol.* janv 2024;36(1):52-60. doi:10.1097/BOR.0000000000000963
99. Patnaik E, Lyons M, Tran K, Pattanaik D. Endothelial Dysfunction in Systemic Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 21 sept 2023;24(18):14385. doi:10.3390/ijms241814385 PubMed PMID: 37762689; PubMed Central PMCID: PMC10531630.

100. Marangoni RG, Korman BD, Wei J, Wood TA, Graham LV, Whitfield ML, et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. avr 2015;67(4):1062-73. doi:10.1002/art.38990 PubMed PMID: 25504959; PubMed Central PMCID: PMC4472310.
101. Finnson KW, Parker WL, Ten Dijke P, Thorikay M, Philip A. ALK1 Opposes ALK5/Smad3 Signaling and Expression of Extracellular Matrix Components in Human Chondrocytes. *J Bone Miner Res*. 1 juin 2008;23(6):896-906. doi:10.1359/jbmr.080209
102. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, et al. Activin Receptor-like Kinase (ALK)1 Is an Antagonistic Mediator of Lateral TGF β /ALK5 Signaling. *Mol Cell*. 1 oct 2003;12(4):817-28. doi:10.1016/S1097-2765(03)00386-1 PubMed PMID: 14580334.
103. Liu J, Xia S, Han P, Zhang M, Wu J, Liao J. Downregulation of KIAA1199 alleviated the activation, proliferation, and migration of hepatic stellate cells by the inhibition of epithelial–mesenchymal transition. *Open Med*. 6 avr 2023;18(1):20230689. doi:10.1515/med-2023-0689

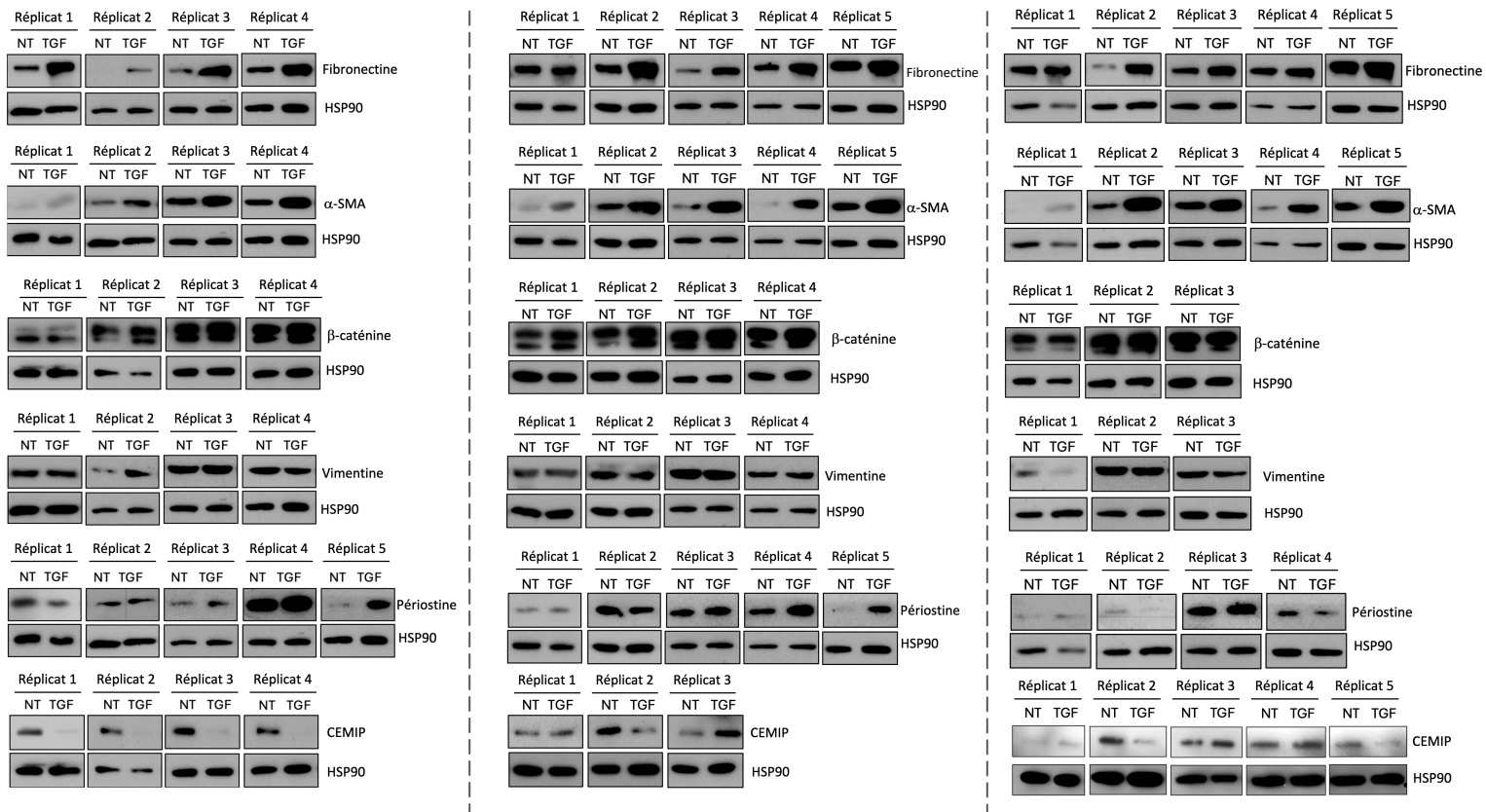
ANNEXES

Stimulation TGF- β 2 jours

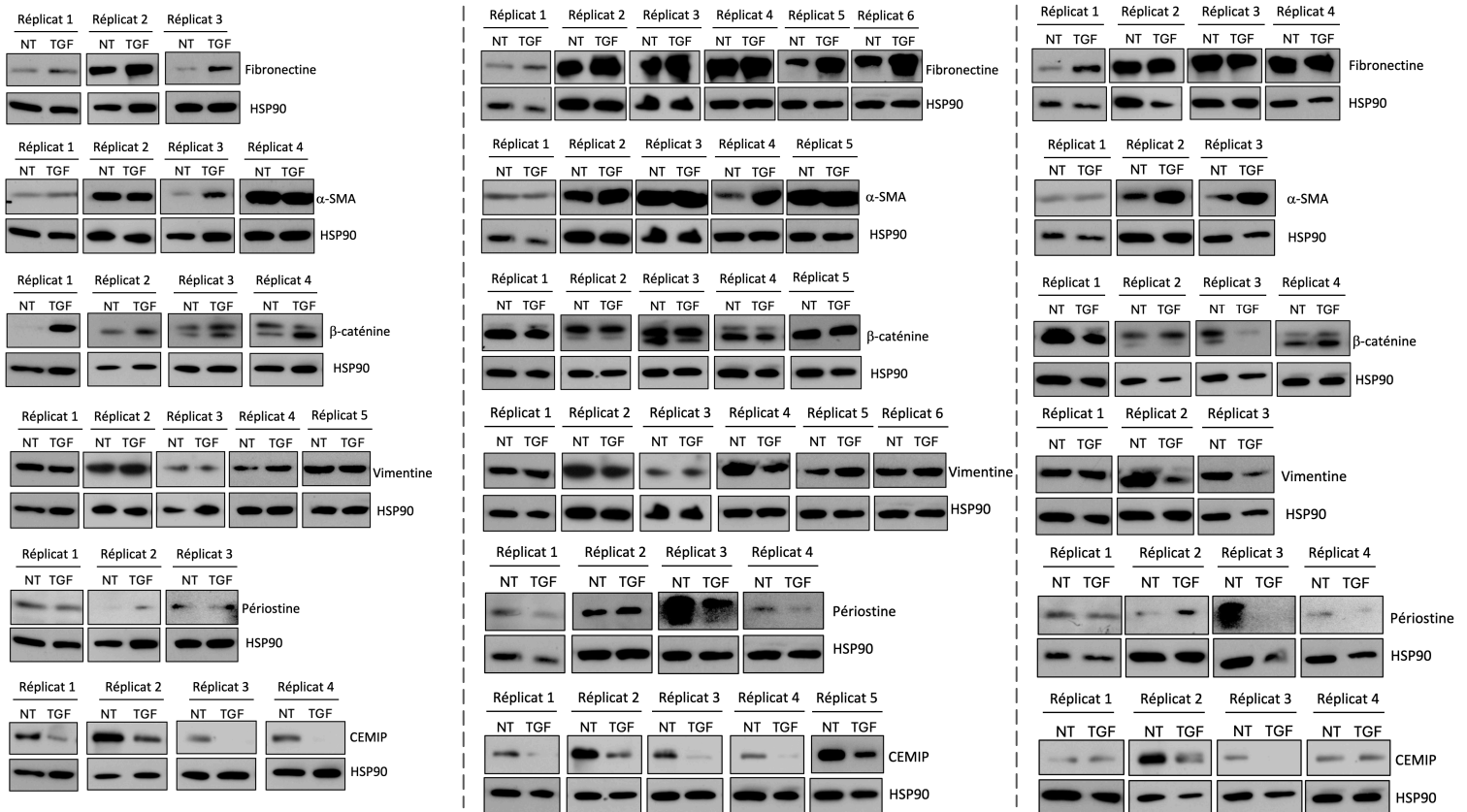
Stimulation TGF- β 5 jours

Stimulation TGF- β 7 jours

Fibroblastes dermiques HDF



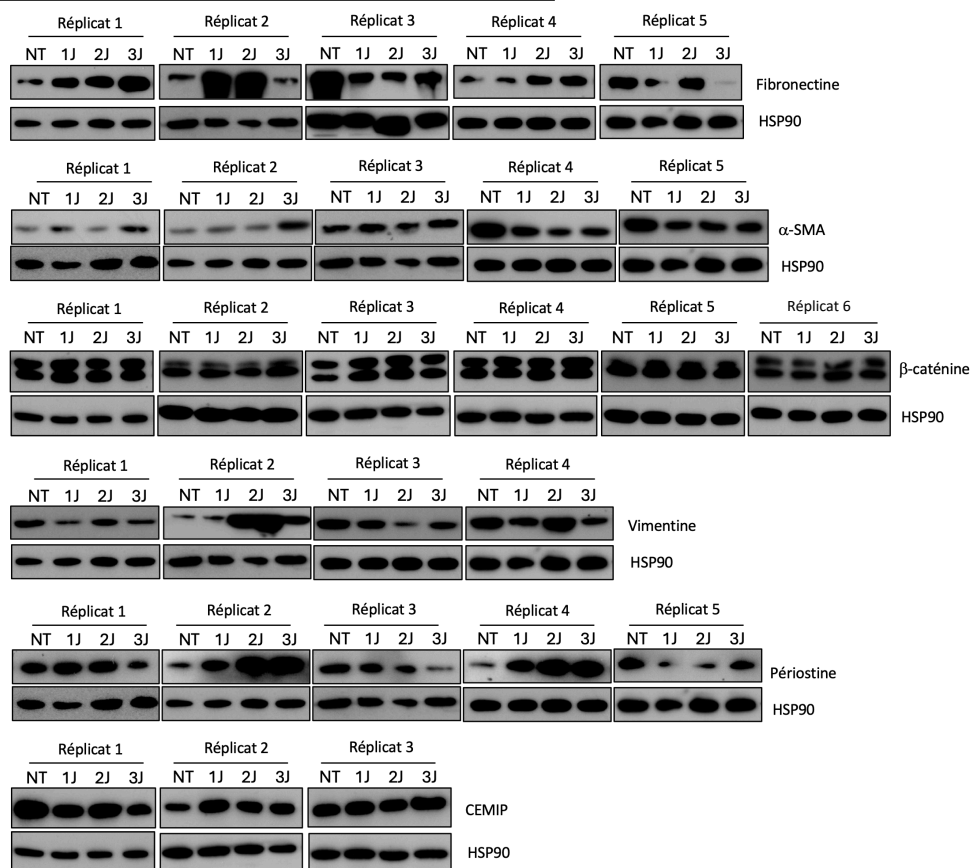
Fibroblastes dermiques primaires



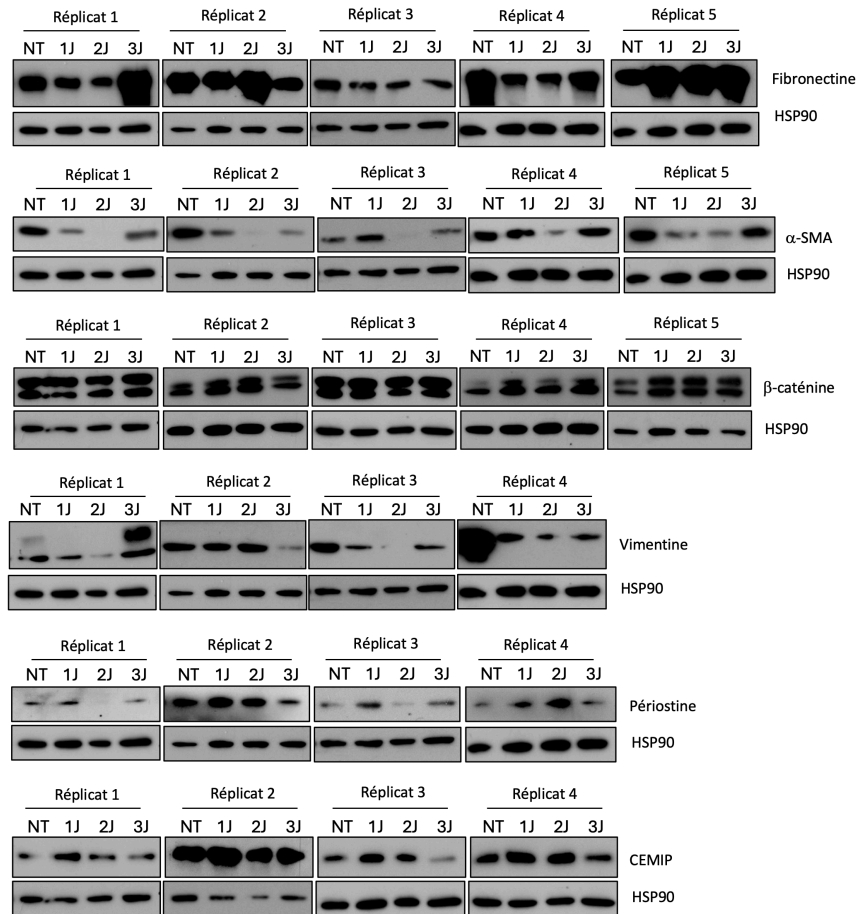
Annexe I : Effet de la stimulation au TGF- β pendant 2, 5 et 7 jours sur l'expression de marqueurs d'EMT, de fibrose et de CEMIP dans les HDF et les fibroblastes primaires.

Fibroblastes dermiques HDF

Effet du milieu conditionné des cellules endothéliales à 2 jours



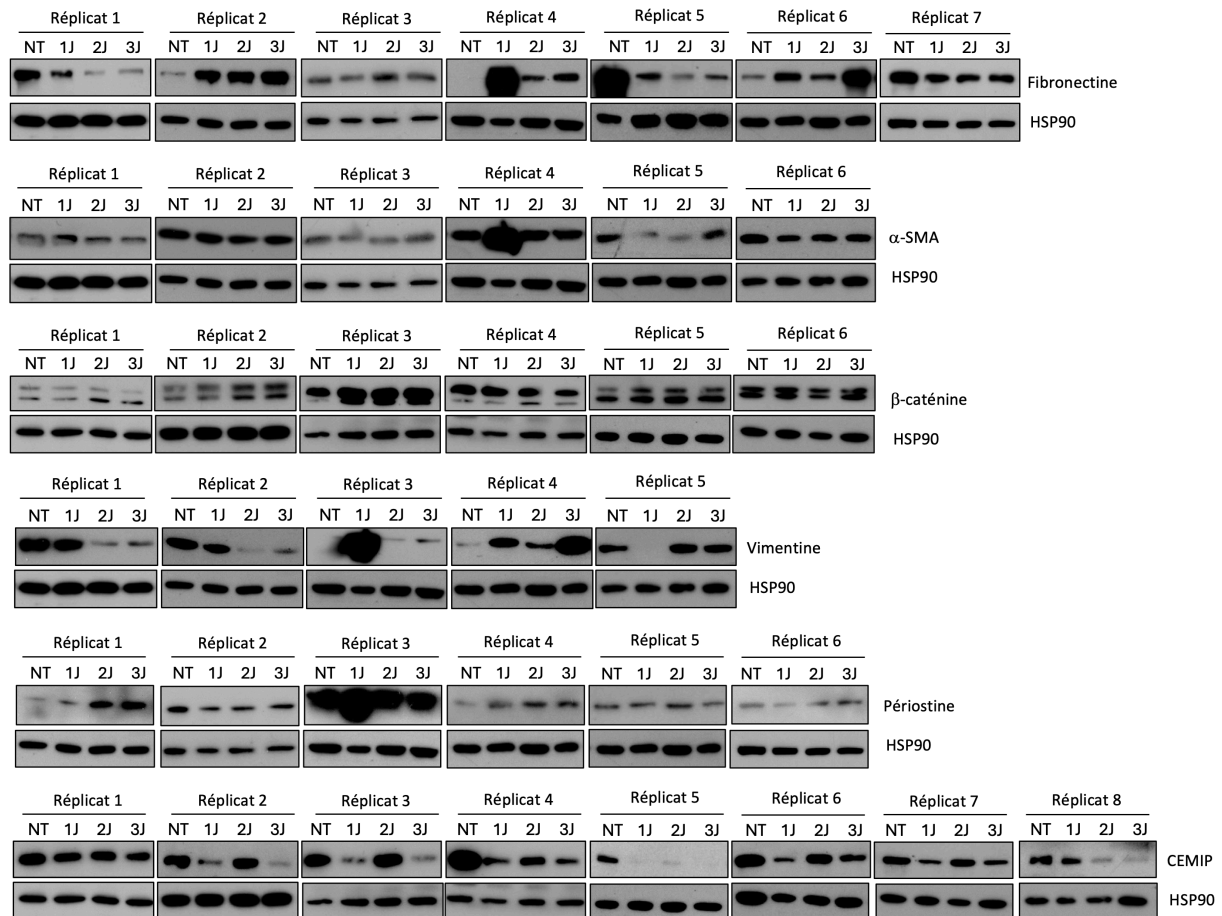
Effet du milieu conditionné des cellules endothéliales à 7 jours



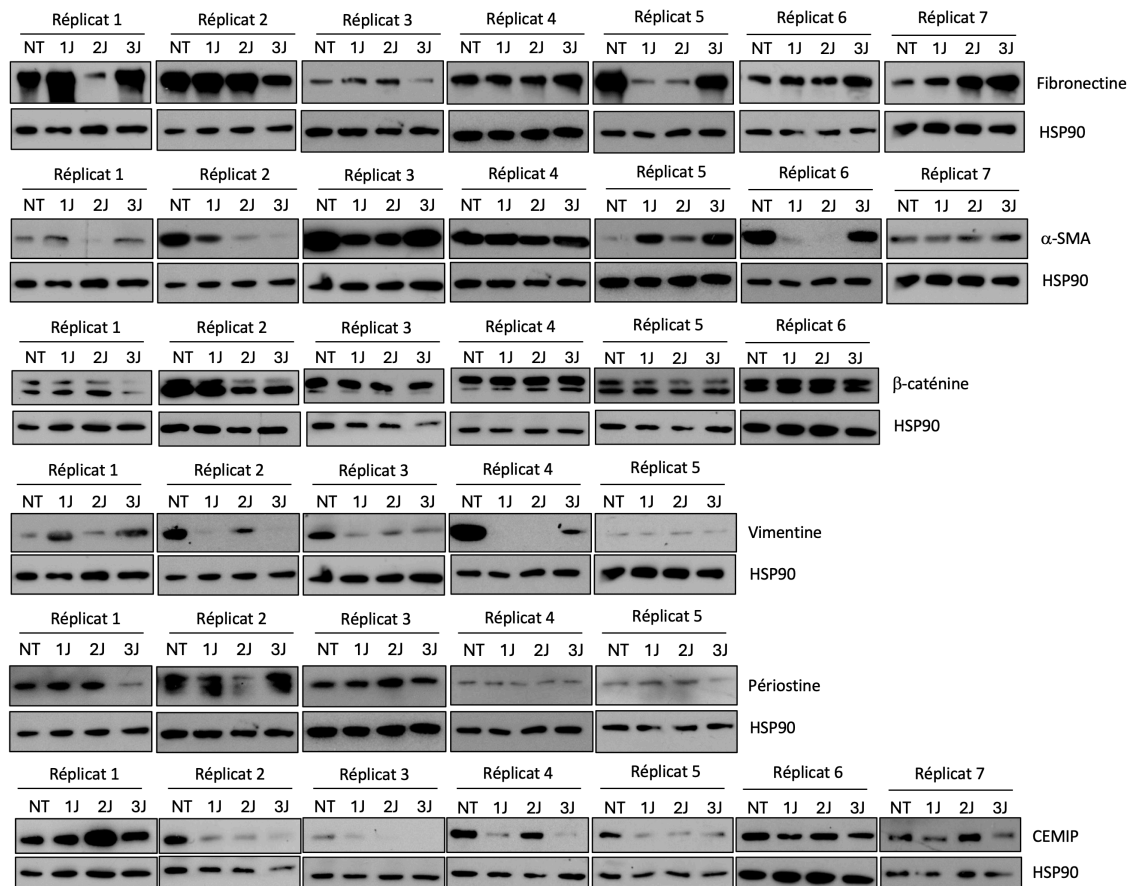
Annexe II : : Effet de la stimulation par les milieux conditionnés de cellules endothéliales pendant 2 et 7 jours sur l'expression de marqueurs d'EMT, de fibrose et de CEMIP dans les HDF.

Fibroblastes dermiques primaires

Effet du milieu conditionné des cellules endothéliales à 2 jours



Effet du milieu conditionné des cellules endothéliales à 7 jours



Annexe III : Effet de la stimulation par les milieux conditionnés de cellules endothéliales pendant 2 et 7 jours sur l'expression de marqueurs d'EMT, de fibrose et de CEMIP dans les fibroblastes primaires.